

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



**Síntese de novos compostos híbridos com  
actividade antimalárica**

Joana Rita Pinto de Magalhães

Dissertação

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

**2012/ 2013**

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



**Síntese de novos compostos híbridos com  
actividade antimalárica**

Joana Rita Pinto de Magalhães

**Dissertação orientada pela Professora Doutora Francisca  
Lopes**

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

**2012/2013**



## Agradecimentos

Agradeço à Professora Francisca Lopes por ter proposto o tema e me ter dado oportunidade de fazer investigação em química farmacêutica e terapêutica. Estou-lhe muito grata por todos os conhecimentos que me permitiu adquirir e por me ter encorajado e orientado ao longo deste ano.

Agradeço aos meus colegas Rudi e Daniela que foram para mim uns verdadeiros co-orientadores na medida em que sem eles teria sido extremamente difícil completar este trabalho. Desde o início, nunca me deixaram desaminar e desafiaram-me sempre a tentar novos procedimentos, fornecendo-me muitas vezes as ferramentas necessárias à sua execução. Com eles cresci muito enquanto profissional e, por isso, estou-lhes muito grata.

Agradeço aos meus colegas de mestrado, em especial à minha colega Ana Cláudia por terem ouvido sempre tanto o meu entusiasmo como a minha frustração e me terem apoiado sempre, dando-me força para continuar o trabalho mesmo quando as moléculas insistiam em não reagir.

Não posso deixar de agradecer a todos os meus colegas de laboratório pois todos eles estiveram sempre disponíveis para me ajudar e partilhar os seus conhecimentos comigo.

Agradeço à minha colega Marta Oliveira por toda a ajuda que me deu com a realização dos ensaios de estabilidade e pelas trocas de ideias estimulantes acerca do funcionamento do HPLC.

Agradeço à Inês Albuquerque por me ter recebido tão bem no IMM e tão pacientemente me ter explicado como se faziam os testes dos compostos na fase hepática da malária. Não posso deixar de lhe agradecer o facto de me ter dado oportunidade de dissecar mosquitos e retirar as suas glândulas salivares.

Agradeço à minha família por terem estado sempre disponíveis para me apoiar e pelo optimismo que demonstraram sempre que eu achava que não ia conseguir obter as minhas moléculas híbridas.

Agradeço ao professor Phil J. Rosenthal e ao Dr. Jiri Gut (UCSF) pelos testes dos compostos na fase sanguínea da malária.

A todos, um muito obrigada!



# Índice

<b>Capítulo 1</b>	<b>1</b>
1. Introdução	2
1.1 Agente Etiológico da malária	3
1.1.1. Ciclo de vida dos parasitas <i>Plasmodium</i>	3
1.1.2. Síntese da Hemozoína, o pigmento da malária	5
1.1.3. Metabolismo dos parasitas <i>Plasmodium</i>	7
1.1.3.1. Cadeia de transporte electrónico mitocondrial	8
1.1.3.1.1. Complexo III – Citocromo bc1	9
1.2 Quimioterapia para a malária	11
1.2.1. Endoperóxidos - Tetraoxanos	12
1.2.1.1. Relações Estrutura - Actividade	12
1.2.1.2. Mecanismo de Acção	14
1.2.1.3. Toxicidade	16
1.2.2. 8-Aminoquinolinas - Primaquina	16
1.2.2.1. Relações Estrutura - Actividade	17
1.2.2.2. Metabolismo	18
1.2.2.3. Mecanismo de Acção	20
1.2.2.4. Toxicidade	20
1.2.3. Piridonas	22
1.2.3.1. Mecanismo de Acção	23
1.2.3.2. Relações Estrutura - Actividade	23
1.3 Complicações da malária	23
1.4 Resistência à quimioterapia	24
1.5 Fármacos Híbridos	24
1.6 A genética e a malária	25
1.7 Âmbito da tese	27
<b>Capítulo 2</b>	<b>29</b>
2.1. Síntese dos compostos híbridos tetraoxano-piridonimina	30
2.1.1. Tetraoxano com função éster	32
2.1.2. Tetraoxano com função álcool	33
2.1.3. Síntese do derivado sulfonado	35

2.1.4. Síntese das aminopiridinas.....	37
2.1.5. Síntese dos compostos híbridos tetraoxano-piridonimina .....	44
2.2. Síntese dos compostos híbridos tetraoxano-aminoquinolina com um <i>linker</i> amida.....	48
2.2.1. Síntese do derivado bromado .....	49
2.2.3. Síntese dos derivados arilo.....	52
2.2.3. Síntese dos derivados amina.....	57
2.2.4. Síntese do tetraoxano com a função ácido carboxílico.....	60
2.2.5. Síntese dos compostos híbridos.....	61
2.3. Síntese dos compostos híbridos tetraoxano-aminoquinolina com <i>linker</i> amina.....	66
<b>Capítulo 3</b> .....	70
3.1. Avaliação da estabilidade metabólica dos compostos híbridos <b>35</b> .....	71
3.1.1. Determinação do comprimento de onda.....	71
3.1.2. Eluente da coluna .....	72
3.2. Cálculo do tempo de meia-vida dos compostos híbridos <b>35</b> .....	73
3.3. Actividade dos compostos híbridos 35 na fase hepática da malária .....	75
3.4. Actividade dos compostos híbridos 35 na fase sanguínea da malária.....	77
<b>Capítulo 4</b> .....	78
Conclusão .....	79
<b>Capítulo 5</b> .....	81
Procedimento Experimental .....	82
5.1. Reagentes .....	82
5.2. Solventes .....	82
5.3. Cromatografia .....	82
5.4. Equipamento .....	83
5.5. Síntese e caracterização de compostos .....	84
5.5.1. Compostos híbridos tetraoxano-piridonimina .....	84
5.5.1.1. Composto 23: Tetraoxano éster.....	84
5.5.1.2. Composto 24: Tetraoxano álcool.....	84
5.5.1.3. Composto 25: Tetraoxano mesilato .....	84
5.5.1.4. Compostos 28: bifenilaminopiridinas.....	85
5.5.1.4.1. Composto 28a: 4-bifenilaminopiridina.....	86
5.5.1.4.2. Compostos 28b: bifenil-3,5-dicloroaminopiridina .....	86
5.5.1.4.3. Compostos 28c: bifenil-3,4-diaminopiridina .....	86



5.5.1.4.4. Compostos 28d: 4-bifenil-3-nitroaminopiridina.....	86
5.5.1.5. Composto 29a: híbrido tetraoxano-bifenilaminopiridina .....	87
5.5.2. Compostos híbridos tetraoxano-aminoquinolina .....	88
5.5.2.1. Composto 31: 5-bromo-6-metoxi-8-nitroquinolina .....	88
5.5.2.2. Composto 32: 5-arilo-6-metoxi-8-nitroquinolina .....	88
5.5.2.2.1. Composto 32a: 5-fluorfenilo-6-metoxi-8-nitroquinolina .....	89
5.5.2.2.2. Composto 32b: 5-clorofenilo-6-metoxi-8-nitroquinolina.....	89
5.5.2.2.3. Composto 32c: 5-bromofenilo-6-metoxi-8-nitroquinolina .....	89
5.5.2.2.4. Composto 32d: 5-fenilo-6-metoxi-8-nitroquinolina .....	89
5.5.2.3. Compostos 33: 5-arilo-6-metoxi-8-aminoquinolina .....	90
5.5.2.3.1. Composto 33a: 5-fluorfenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina .....	90
5.5.2.3.2. Composto 33b: 5-clorofenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina .....	90
5.5.2.3.3. Composto 33c: 5-bromofenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina .....	90
5.5.2.3.4. Composto 33d: 5-fenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina .....	90
5.5.2.4. Compostos 34: tetraoxano ácido .....	91
5.5.2.5. Compostos 35: compostos híbridos tetraoxano-5-arilo-6-metoxi-8- aminoquinolina com um <i>linker</i> amida.....	90
5.5.2.5.1. Composto 35a: híbrido tetraoxano-5-fluorfenilo-6-metoxi-8- aminoquinolina.....	92
5.5.2.5.2. Composto 35b: híbrido tetraoxano-5-clorofenilo-6-metoxi-8- aminoquinolina.....	92
5.5.2.5.3. Composto 35c: híbrido tetraoxano-5-bromofenilo-6-metoxi-8- aminoquinolina.....	93
5.5.2.5.4. Composto 35d: híbrido tetraoxano-5-fenilo-6-metoxi-8- aminoquinolina.....	93
5.5.2.6. Composto 36: tetraoxano hidroxamato .....	93
5.5.2.7. Composto 37: tetraoxano aldeído.....	94
5.5.2.8. Composto 38: híbrido tetraoxano-5-fenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina com um <i>linker</i> amina .....	94
5.6. Determinação da actividade do enzima CYP2E1 nos microsomas de fígado de rato ....	95
5.7. Determinação da estabilidade metabólica dos híbridos 35 – híbridos tetraoxano-5-arilo- 6-metoxi-8-aminoquinolina com um <i>linker</i> amida.....	97
5.8. Determinação da actividade e da toxicidade dos compostos 35 na fase hepática da malária.....	97
<b>Capítulo 6</b> .....	99
Bibliografia .....	100

**Capítulo 7** ..... 106

Anexos ..... 107

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Mapa ilustrativo das regiões do mundo mais afectadas pela malária.....	2
<b>Figura 2</b> – Ciclo de Vida dos parasitas <i>Plasmodium</i> .....	5
<b>Figura 1</b> – Esquema representativo da degradação da Hb a Hz no eritrócito.....	6
<b>Figura 2</b> – Modelos representativos da estrutura da Hz.....	7
<b>Figura 3</b> – Cadeia transportadora de Electrões na membrana mitocondrial dos parasitas <i>Plasmodium</i> .....	8
<b>Figura 4</b> – Estrutura do Complexo citocromo bc1 da levedura, homólogo ao dos parasitas <i>Plasmodium</i> .....	9
<b>Figura 5</b> – Mecanismo catalítico do complexo bc1.....	10
<b>Figura 6</b> – Estrutura química geral da Artemisinina (1), 1,2,4-Trioxolano (2) e 1,2,4,5-Tetraoxano (3). .....	12
<b>Figura 7</b> – Efeito do impedimento estérico da ligação peroxídica na actividade do composto. ....	13
<b>Figura 8</b> – Estrutura e Actividade antimalárica dos compostos 7 na estirpe D6 do <i>P. falciparum</i> .....	13
<b>Figura 9</b> – Estrutura e Actividade dos monospiro (9) e dispiro tetraocanos (10) na estirpe 3D7 do <i>P. falciparum</i> .....	14
<b>Figura 10</b> – Estrutura e Actividade dos tetraoxanos que contêm um grupo polar e um grupo lipofílico.....	14
<b>Figura 11</b> – Mecanismo proposto para a decomposição dos tetraoxanos induzida pelo ferro no estado de oxidação II com formação das espécies intermediárias Fe(IV)=O.....	15
<b>Figura 12</b> – Mecanismo proposto para a formação de aductos heme-tetraoxano.....	16
<b>Figura 13</b> – Estrutura química do corante azul de metileno.....	16

<b>Figura 14</b> – Estrutura química dos fármacos pamaquina (10), pentaquina (11) e primaquina (12).....	17
<b>Figura 15</b> – Representação das posições do anel quinolínico da primaquina que foram alvo de modificações.....	17
<b>Figura 16</b> – Estrutura química dos principais metabolitos da primaquina.....	19
<b>Figura 17</b> – Representação esquemática do mecanismo de toxicidade da primaquina.....	21
<b>Figura 18</b> – Estrutura química da Tafenoquina.....	22
<b>Figura 19</b> – Estrutura química do fármaco Clopidol.....	22
<b>Figura 20</b> – Representação esquemática dos tipos de moléculas híbridas.....	25
<b>Figura 21</b> – Retrossíntese do composto híbrido <b>29a</b> .....	31
<b>Figura 22</b> – Mecanismo proposto para a síntese do tetraoxano éster ( <b>23</b> ).....	32
<b>Figura 23</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>23</b> .....	33
<b>Figura 24</b> – Mecanismo proposto para a síntese do tetraoxano álcool ( <b>24</b> ).....	34
<b>Figura 25</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>24</b> .....	34
<b>Figura 26</b> – Mecanismo proposto para a síntese do tetraoxano sulfonado.....	35
<b>Figura 27</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>25a</b> .....	36
<b>Figura 28</b> – Estrutura geral das aminopiridinas <b>28</b> .....	37
<b>Figura 29</b> – Mecanismo proposto para a síntese dos compostos <b>28a – d</b> .....	38
<b>Figura 30</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>28a</b> .....	38
<b>Figura 31</b> – Espectro COSY do composto <b>28a</b> .....	39
<b>Figura 32</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>28d</b> .....	40
<b>Figura 33</b> – Espectro Cosy do composto <b>28d</b> .....	40
<b>Figura 34</b> – Mecanismo proposto para a síntese dos compostos <b>28b e c</b> pela reacção de Buchwald Hartwig.....	41

<b>Figura 35</b> – Produtos obtidos na síntese do composto <b>28b</b> por reacção de Buchwald-Hartwig.....	42
<b>Figura 38</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>28b</b> .....	42
<b>Figura 39</b> – Espectro COSY do composto <b>28b</b> .....	43
<b>Figura 36</b> – Mecanismo proposto para a síntese dos compostos <b>29</b> .....	44
<b>Figura 37</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>29a</b> .....	45
<b>Figura 38</b> – Espectro COSY do composto <b>29a</b> .....	46
<b>Figura 39</b> – Retrossíntese dos compostos híbridos tetraoxano - aminoquinolina com <i>linker</i> amida ( <b>35</b> ).....	48
<b>Figura 40</b> – Mecanismo proposto para a síntese do composto <b>31</b> .....	50
<b>Figura 41</b> – Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto <b>31</b> .....	50
<b>Figura 42</b> – Espectro COSY do composto <b>31</b> .....	51
<b>Figura 43</b> – Ciclo Catalítico da reacção de Suzuki.....	53
<b>Figura 44</b> – Estrutura geral dos compostos <b>32</b> . R= F, Cl, Br ou H.....	54
<b>Figura 45</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>32b</b> .....	55
<b>Figura 46</b> – Mecanismo proposto para a síntese dos compostos <b>33a – d</b> .....	58
<b>Figura 47</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>33b</b> .....	58
<b>Figura 48</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>34</b> .....	60
<b>Figura 49</b> – Mecanismo proposto para a síntese dos compostos <b>32</b> após activação do ácido carboxílico com o TBTU.....	62
<b>Figura 50</b> – Mecanismo proposto para a síntese dos compostos <b>35</b> após conversão do ácido carboxílico num anidrido.....	62
<b>Figura 51</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto <b>35b</b> .....	63
<b>Figura 52</b> – Espectro COSY do composto <b>35b</b> .....	63

<b>Figura 53</b> – Mecanismo proposto para síntese do tetraoxano com função aldeído (Composto <b>37</b> ).....	67
<b>Figura 54</b> – Espectros $^1\text{H}$ RMN dos compostos <b>36</b> (A) e <b>37</b> (B).....	68
<b>Figura 55</b> – Espectro $^1\text{H}$ RMN do composto híbrido <b>38</b> .....	69
<b>Figura 56</b> – Sobreposição dos cromatogramas do composto <b>35d</b> usando como eluente uma mistura MeOH:H <sub>2</sub> O:TFA nas proporções 94:5:1.....	73
<b>Figura 57</b> – Variação da concentração do composto <b>35d</b> na mistura reaccional, ao longo do tempo.....	74
<b>Figura 58</b> – Possíveis estruturas de metabolitos resultantes da incubação dos compostos <b>35a – d</b> com microsomas.....	75
<b>Figura 59</b> – Confluência celular e percentagem de infecção nas células de hepatoma incubadas com os compostos híbridos <b>35b – d</b> .....	76
<b>Figura 60</b> – Curva de Calibração usada para determinar a actividade do enzima CYP2E1.....	96

## Índice de Esquemas

<b>Esquema 1:</b> Procedimento sintético utilizado para obter o híbrido 29 .....	31
<b>Esquema 2:</b> Procedimento sintético utilizado para obter os híbridos 32 .....	49
<b>Esquema 3:</b> Representação esquemática dos intermediários envolvidos na síntese dos híbridos 32 .....	61
<b>Esquema 4:</b> Representação esquemática da reacção que permitiria obter os derivados 35 por aminação 35 .....	68

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Principais fármacos existentes no mercado que se destinam ao tratamento da malária.....	11
<b>Tabela 2</b> - Tabela resumo dos rendimentos da síntese das aminopiridinas pelos métodos A – D.....	37
<b>Tabela 3</b> - Variação das condições reaccionais para tentar sintetizar os compostos <b>29</b> : A aminopiridinina foi activada antes de ser adicionada à mistura reaccional.....	44
<b>Tabela 4</b> - Desvios químicos dos carbonos do composto <b>29a</b> .....	47
<b>Tabela 5</b> - Rendimentos das reacções de Suzuki efectuadas de acordo com os métodos A, B e C.....	54
<b>Tabela 6</b> – Desvios químicos dos protões dos compostos <b>32a, c e d</b> .....	56
<b>Tabela 7</b> - Desvios químicos dos protões dos compostos <b>33a, c e d</b> .....	59
<b>Tabela 8</b> - Desvio químico dos carbonos do composto <b>35b</b> .....	64
<b>Tabela 9</b> - Desvios químicos de carbono e protão dos compostos <b>35a, c e d</b> .....	64
<b>Tabela 10</b> - Lã molecular, ponto de fusão e pureza dos compostos híbridos <b>35</b> .....	66
<b>Tabela 11</b> - Tempo de retenção dos compostos híbridos <b>35a – d</b> . <u>Condições</u> : coluna 4 LiChrospher®100 RP18 com partículas de 5µM; <u>Eluente</u> : mistura de MeOH:H <sub>2</sub> O: TFA nas proporções 94:5:1; λ= 248nm; Fluxo isocrático de 1ml/min.....	72
<b>Tabela 12</b> – Tempo de meia vida e constantes de velocidade dos compostos híbridos <b>35a – d</b> determinadas a partir da média dos três ensaios metabólicos efectuados.....	74
<b>Tabela 13</b> – Actividade esquizotóxica sanguínea, determinada <i>in vitro</i> , peso molecular e ClogP da artemisinina e dos compostos híbridos <b>35a– d</b> .....	77



## Resumo

A organização mundial de saúde estima que a malária afecte mais de 225 milhões de pessoas, causando cerca de 700 mil mortes em cada ano. O desenvolvimento de resistência aos fármacos antimaláricos tem condicionado a terapêutica da patologia pelo que a organização mundial de saúde recomenda o uso de terapias baseadas na combinação da artemisinina (ACT). Assim, uma das abordagens mais recentes para desenvolver novos antimaláricos tem sido a síntese de compostos híbridos nos quais dois farmacóforos distintos são covalentemente ligados numa única entidade química.

Existem já alguns relatos que evidenciam as vantagens de se combinarem farmacóforos com diferentes alvos numa única molécula, assim, neste trabalho começou-se por sintetizar híbridos baseados nos farmacóforos 1,2,4,5-tetraoxano e piridonimina. Apesar de terem sido desenvolvidas diferentes abordagens sintéticas, os rendimentos da síntese dos compostos híbridos foram baixos e necessitam de mais estudos.

De seguida, virámos a nossa atenção para os híbridos baseados em tetraoxanos que continham o farmacóforo 8-aminoquinolina (8-AQ). Os compostos sem cadeia aminoalquílica revelaram-se pouco activos face aos seus correspondentes que continham a cadeia como a primaquina. O mesmo tipo de actividade foi observado para a fase sanguínea.

Os estudos metabólicos dos híbridos baseados em tetraoxanos revelaram que aqueles que continham um grupo electroatractor no arilo na posição 5 do anel quinolínicos eram metabolizados a uma taxa superior do que os correspondentes que continham apenas o grupo arilo.

Estes resultados sugerem que é necessário um *linker* entre o grupo 8-AQ e o tetraoxano. Estudos posteriores são necessários para identificar o comprimento ideal do *linker*.

## Abstract

The latest World Health Organization (WHO) data suggest that 225 million people are at risk of malaria and about 700 thousand die every year. The emergence of drug resistance is a huge concern and thus WHO recommends artemisinin-based combination therapies (ACT) to treat malaria. In this way, one of the most recent approaches to develop new antimalarial agents is to synthesize hybrid compounds where two different pharmacophores are connected into a single chemical entity.

Having in mind the reports that show the possible advantages in combining pharmacophores with different targets into a single molecule, the first goal of this thesis was to synthesize hybrids with 1,2,4,5-tetraoxane and 4-pyridonimine moieties. Different synthetic approaches were developed but in all cases the yields of the target hybrid compounds were low and precluded further studies. We then turned our attention to tetraoxane based hybrids containing 8-aminoquinoline (8-AQ) partner pharmacophores. Compounds lacking the amino alkyl chain were less active against the liver stage of malaria infection than their counterparts containing the side chain on with primaquine. The same activity trend was observed for the blood stage.

The metabolic study of the tetraoxane based hybrids revealed that compounds with a electron withdrawing substituent at 5-aryl group of the quinoline ring were metabolized at higher rates than their 5-phenyl counterpart.

These results suggest that a linker is required between the 8-AQ group and the tetraoxane. Further studies are required to ascertain the optimal linker's length.

## **Lista de Abreviaturas**

MSP – proteínas de superfície do merozoito

AMA-1 – antigénio da membrana apical 1

Hb – hemoglobina

Hz – hemozoína

PfHT – transportador de hexoses de alta afinidade

LDH – lactato desidrogenase

NADH - dinucleótido adenina nicotinamida reduzido

NAD<sup>+</sup> - dinucleótido adenina nicotinamida oxidado

ATP – adenosina trifosfato

Succinil CoA – succinil coenzima A

ART – artemisinina

CYP1A2 – citocromo P450 1A2

8-AQ – 8-aminoquinolinas

CYP2B6 – citocromo P450 2B6

CYP2D6 – citocromo P450 2D6

CYP2E1 – citocromo P450 2E1

CYPs – várias isoformas do citocromo P450

CYP 450 – citocromo P450

MAO – monoamina oxidase

5-HPQ – 5-hidroxiprimaquina

6PGD – glucose-6-fosfato desidrogenase

CO – monóxido de carbono

OMS – organização mundial de saúde

ACT – terapias de combinação baseadas na artemisinina

TBTU – O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio tetrafluoroborato

HPLC – cromatografia líquida de elevada pressão

ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção

TFA – ácido trifluoroacético

k – constante de velocidade

IC<sub>50</sub> – concentração de fármaco que inibe 50% do crescimento do parasita

SD – desvio padrão

ClogP – ClogP é um valor calculado do logaritmo do coeficiente de partição entre o 1-octanol e a água

THF – tetrahidrofurano

IV – infravermelho

DMF – dimetilformamida

ESI – ionização por *electrospray*

IE – ionização por impacto electrónico

# Capítulo 1

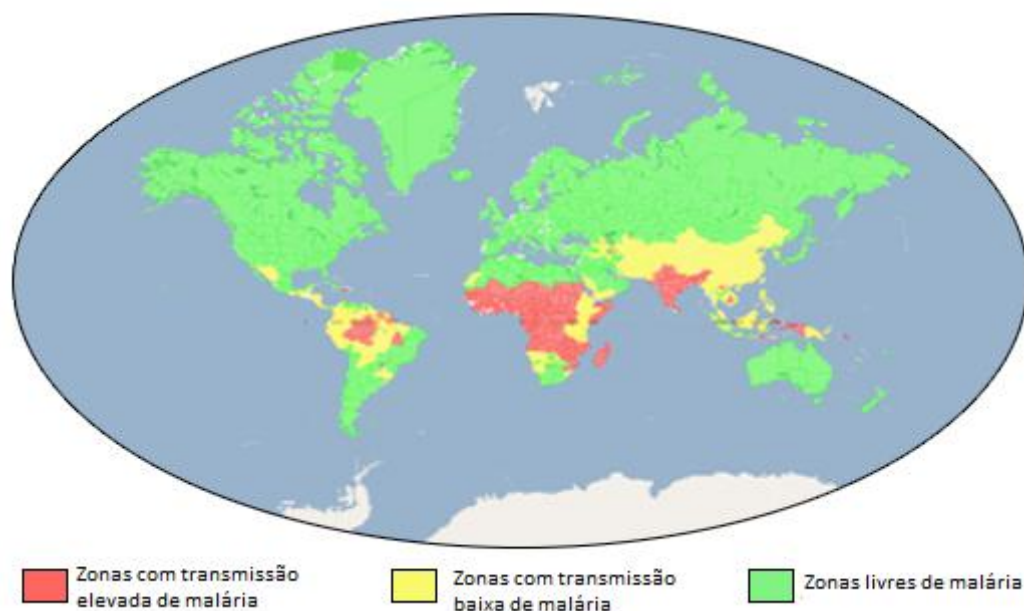
## Introdução

No século XIX a malária ameaçava mais de metade da população mundial, sendo que por cada dez pessoas que contraíam a doença, uma morria. <sup>[1]</sup> Assim foram desenvolvidos insecticidas e quimioterapia numa campanha para erradicar a malária. Apesar do forte impacto desta campanha, entre 1970 e 2000, a patologia ressurgiu poderosamente. <sup>[2]</sup>

Actualmente a malária ainda é um grave problema de saúde pública e embora na última década tenha havido uma redução do número de casos, a organização mundial de saúde estima que a malária afecte mais de 225 milhões de pessoas, causando cerca de 700 mil mortes em cada ano. <sup>[3, 4, 5]</sup>

Dado a imunidade parcial à malária ser adquirida ao longo dos anos de exposição à infecção, metade da população mundial, nomeadamente crianças com idades inferiores a cinco anos, mulheres grávidas e viajantes de regiões livres de malária estão em risco de contrair a doença. <sup>[6, 7]</sup>

A doença existe essencialmente em áreas tropicais e subtropicais, no entanto a África subsariana e algumas zonas da Oceania como a Papua Nova Guiné são os locais com maior transmissão (**Figura 1**). <sup>[8]</sup> Estima-se que uma criança africana tenha entre 1,6 a 5,4 episódios de febre devido à malária, em cada ano. Também neste continente a doença é responsável pela morte de uma criança, a cada 30s. <sup>[9]</sup>



**Figura 61** – Mapa ilustrativo das regiões do mundo mais afectadas pela malária. Imagem adaptada de <http://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>.

## 1.1 Agente Etiológico da malária

A malária é causada por parasitas sanguíneos do género *Plasmodium*, no entanto das mais de cem espécies existentes apenas cinco infectam o Homem: *P. falciparum*; *P. vivax*; *P. ovale*; *P. malariae* e *P. knowlesi*.<sup>[6, 7, 9, 10]</sup> As diversas espécies diferem na distribuição geográfica, aparência microscópica, sintomas clínicos e potencial para o desenvolvimento de resistência aos fármacos antimaláricos.<sup>[11]</sup>

As espécies mais comuns são o *P. falciparum* e o *P. vivax*.<sup>[7]</sup> Enquanto o primeiro é o mais perigoso e é responsável pela maioria dos casos clínicos de malária em regiões tropicais, o segundo apresenta uma larga distribuição geográfica e é o mais abundante<sup>[1, 5, 6, 10, 12]</sup>. O *P. vivax* é a espécie com maior prevalência na América Latina, Sudeste Asiático, Este do Mediterrâneo e Oeste do Pacífico. Recentemente esta espécie reemergiu em zonas previamente livres da doença, como as regiões temperadas da Grécia, Córsega, Península da Coreia, China Central e Austrália.<sup>[5, 12]</sup>

As espécies com menor prevalência e que causam as formas menos graves da doença são o *P. malariae* e o *P. ovale*.<sup>[1, 5]</sup> O *P. malariae* está amplamente distribuído, já o *P. ovale* é prevalente na África subsariana e é endémico na Papua Nova Guiné e Filipinas.<sup>[1]</sup>

O *P. knowlesi*, uma espécie conhecida por causar malária em macacos, está presente no Sudeste Asiático.<sup>[5]</sup>

### 1.1.1. Ciclo de Vida dos parasitas *Plasmodium*

O ciclo de vida do parasita da malária divide-se em duas fases: fase sexual (esporogonia) que ocorre no mosquito e fase assexual (esquizogonia) que ocorre no hospedeiro humano. A infecção do hospedeiro humano começa com a picada de um mosquito *Anopheles* fêmea infectado, que inocula esporozoítos no tecido subcutâneo quando faz uma refeição de sangue. Os esporozoítos entram na corrente sanguínea e migram para o fígado onde invadem os hepatócitos através das interacções entre as proteínas superficiais dos esporozoítos e os proteoglicanos expressos pelas células estreladas hepáticas do hospedeiro. Os esporozoítos do *P. vivax* e *P. ovale* podem permanecer latentes nos hepatócitos humanos (hipnozoítos) por períodos que podem atingir vários anos.<sup>[6, 5, 13, 14]</sup> Uma vez no interior do hepatócito ocorre esquizogonia exoeritrocítica e formam-se merozoítos que são libertados na corrente sanguínea. Estudos publicados recentemente sugerem que para evitar a fagocitose por células dendríticas e de Kupffer, o parasita da malária forma merossomas nos hepatócitos infectados para que haja uma entrada directa dos parasitas na circulação sanguínea. Após entrarem em

circulação, os merozoitos iniciam a fase eritrocítica da malária, levando ao aparecimento dos sintomas da doença que incluem febre, arrepios, dor de cabeça e exaustão. A ligação dos merozoitos à superfície do eritrócito ocorre sob qualquer orientação do parasita e é mediada pelas proteínas de superfície do merozoito (MSP). De seguida, ocorre reorientação da terminação apical para a superfície do eritrócito mediado pela proteína transmembranar AMA-1 (antigénio da membrana apical-1). Para entrar no eritrócito, forma-se uma junção apertada entre o parasita e a membrana do eritrócito que se move desde a terminação apical do merozoito à terminação posterior e cria um vacúolo parasitário. Assim que está dentro do eritrócito o merozoito inicia divisão assexual passando por diversas fases: merozoito, anel, trofozoito e esquizonte. Os eritrócitos infectados sofrem lise e libertam os merozoitos na corrente sanguínea que invadem novos eritrócitos. Durante a lise eritrocitária o conteúdo das células infectadas é libertado em circulação e a produção de citocinas pro-inflamatórias é estimulada. Uma pequena proporção dos merozoitos diferencia-se em micro e macro-gametócitos que permanecem nos eritrócitos sendo ingeridos por um mosquito *Anopheles*, aquando de uma nova picada. Uma vez no mosquito, gametócitos masculinos e femininos juntam-se e formam um zigoto. Entre 18 e 24h o zigoto transforma-se num oocineto móvel que origina um único oócisto capaz de formar cerca de 10 000 esporozoítos. Os esporozoítos móveis migram para as glândulas salivares do mosquito e acumulam-se nas células acinar. Posteriormente, o mosquito volta a picar um hospedeiro vertebrado e o ciclo parasitário começa de novo (**Figura 2**). <sup>[6, 9, 13, 14]</sup>



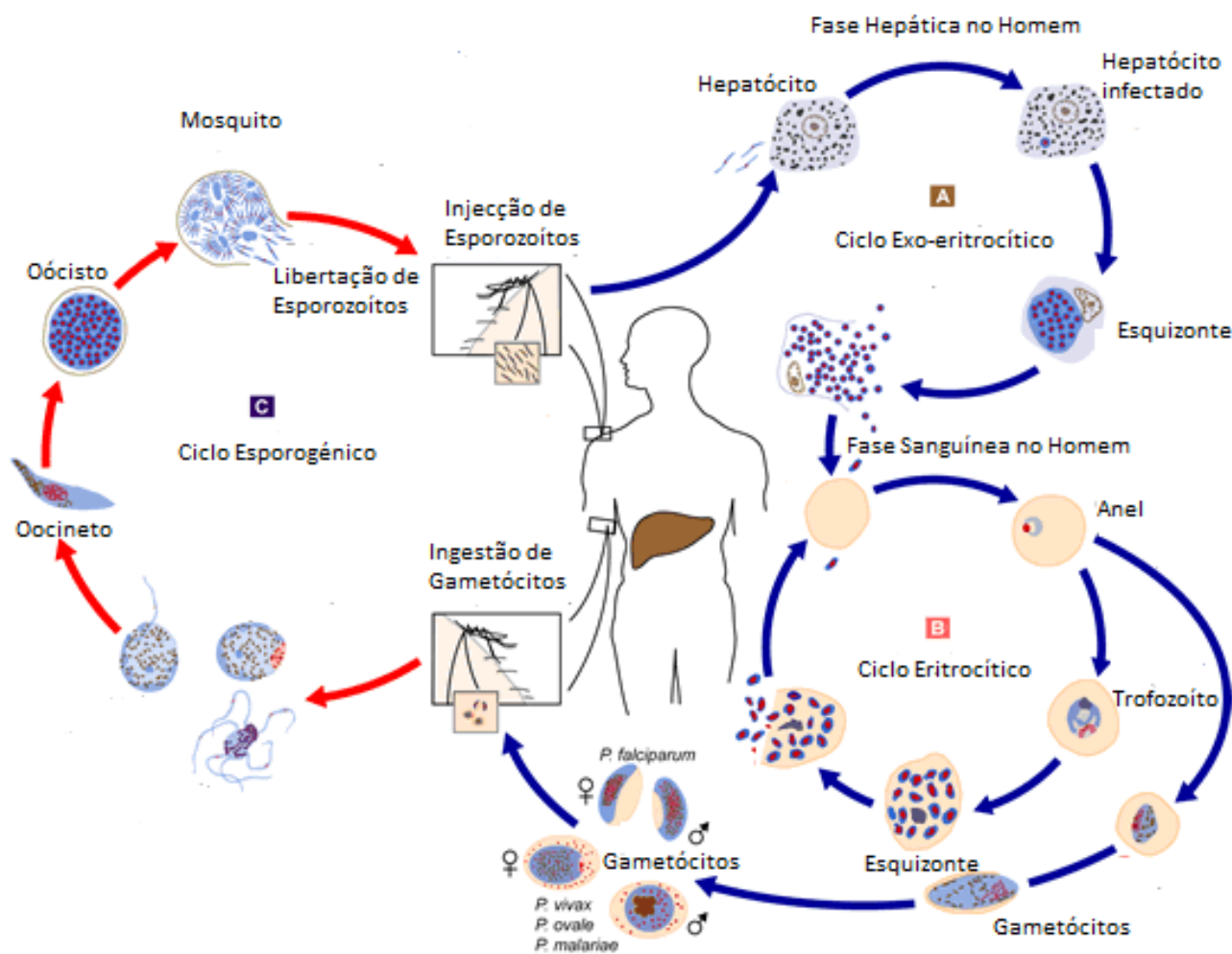
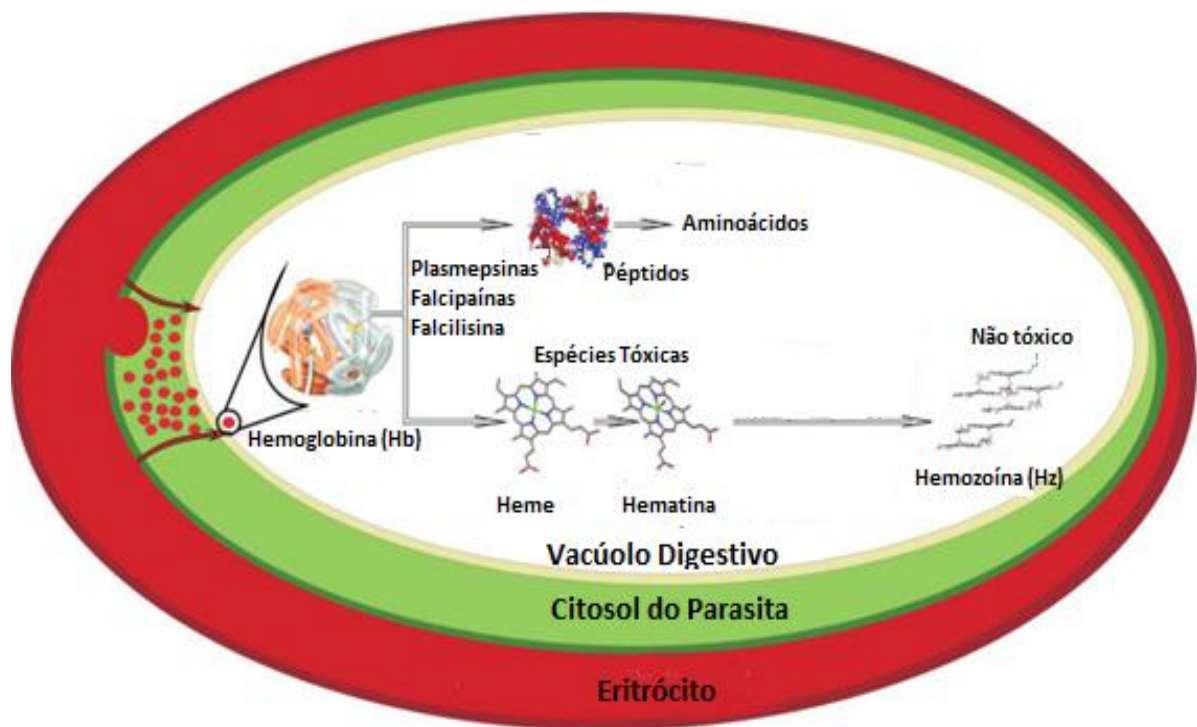


Figura 62 - Ciclo de vida dos parasitas *Plasmodium*. Adaptado de <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>.

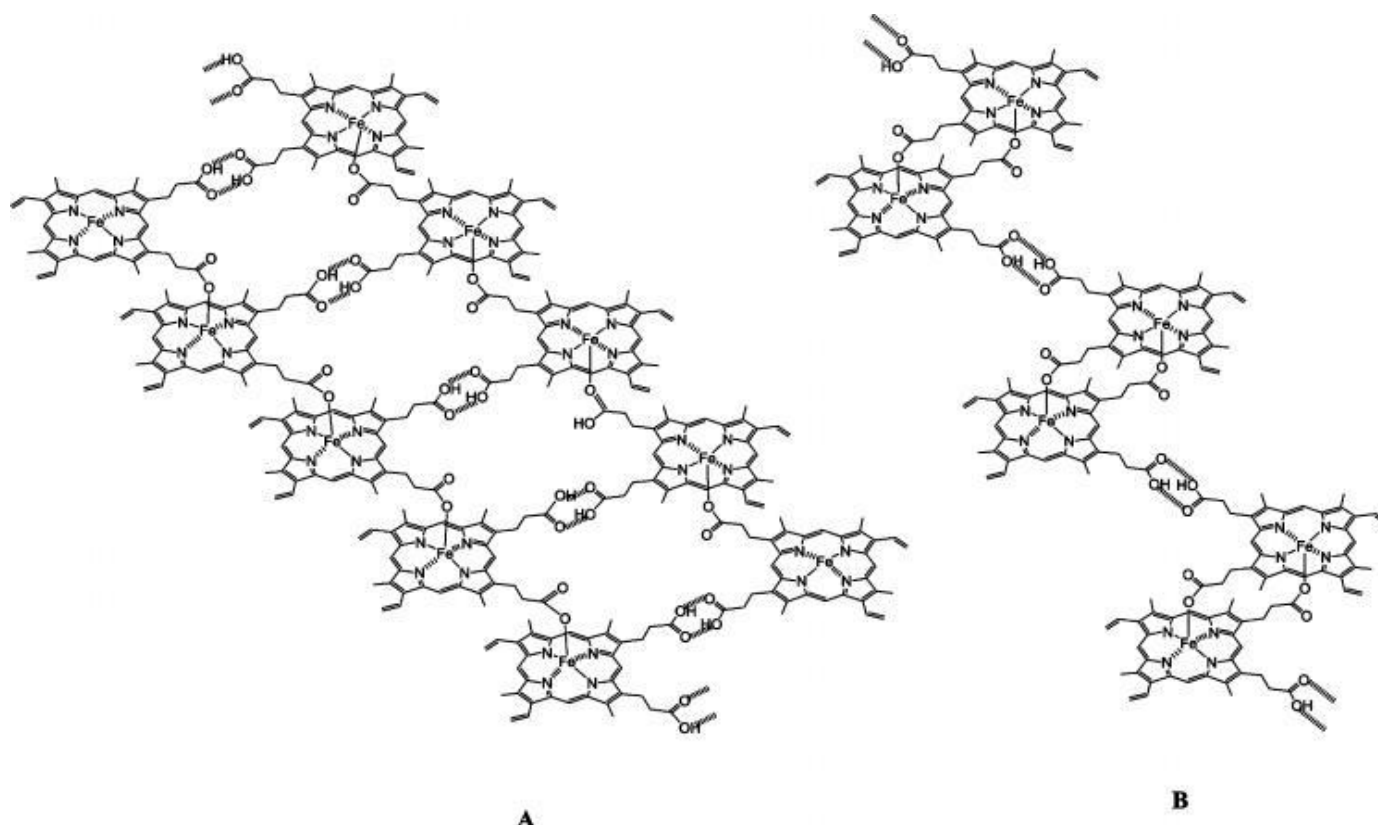
### 1.1.2. Síntese da Hemozoína, o pigmento da malária

O parasita da malária tem uma capacidade limitada para a síntese *de novo* de aminoácidos e a sua sobrevivência depende da proteólise da hemoglobina (Hb). Assim, cerca de 80% da Hb presente no eritrócito infectado é ingerida pelos parasitas na forma de trofozoítos e transportada por vesículas citossomais que se fundem com o vacúolo digestivo. A proteólise da Hb envolve quatro endopeptidases aspárticas (plasmepsinas), três endopeptidases de cisteína (falcipainas) e a metaloprotease falcilisina. A Hb presente no eritrócito é digerida no vacúolo digestivo ácido (pH entre 5,2 e 5,6) e liberta ferro livre (Fe(II)PPIX) que é subsequentemente oxidado a hematina (Fe(III)PPIX). A hematina livre pode causar danos ao metabolismo celular pela inibição de enzimas, peroxidação das membranas e produção de espécies reactivas de oxigénio no ambiente ácido do vacúolo digestivo. Para se proteger o parasita elimina a

hematina através da sua polimerização em hemozoína (Hz) (**Figura 3**). A Hz é um agregado não covalente de várias unidades de hematina ligadas através de ligações coordenadas formadas entre o Fe(III) de uma hematina e a cadeia lateral carboxilato da unidade adjacente (**Figura 4**). A Hz é insolúvel e acumula-se nos tecidos linfáticos, fígado, medula óssea e cérebro porque durante a fase de lise dos eritrócitos todo o conteúdo celular é libertado em circulação e muitas células do sistema imunitário interagem e internalizam tanto a Hz como os eritrócitos infectados [6, 9, 13, 14, 15].



**Figura 63** - Esquema representativo da degradação da Hb a Hz no eritrócito. Adaptado de 9.



**Figura 64 - Modelos representativos da estrutura da Hz.**

Os dois modelos baseiam-se na ligação ferro – oxigénio que junta o ferro ao oxigénio da cadeia lateral do grupo carboxilato da FePPiX adjacente. O modelo A descreve a Hz como um polímero de FePPiX com ligações coordenadas numa cadeia de grupos heme. Cadeias opostas interagem via ligações de hidrogénio e a adição de hemes ocorre em cada terminal, sendo que apenas um único ferro está localizado entre cada anel de porfirina. O modelo B postula que a Hz é um dímero cíclico de grupos heme, no qual cada um é dimerizado por um processo mediado pelas ligações ferro – carboxilato. Os dímeros ligam-se entre si através de ligações de hidrogénio estabelecidas entre os restantes grupos carboxilato livres. Adaptado de 9.

### 1.1.3. Metabolismo dos parasitas *Plasmodium*

As formas assexuais eritrocíticas e os gametócitos captam a glucose via difusão facilitada através de um transportador de hexoses de alta afinidade (PfHT) e metabolizam-na a piruvato que é posteriormente convertido em lactato pelo enzima lactato desidrogenase (LDH). A conversão do piruvato a lactato leva à oxidação do dinucleótido adenina nicotinamida (NADH) a  $\text{NAD}^+$  essencial ao funcionamento da glicólise. <sup>[14, 15, 16]</sup>

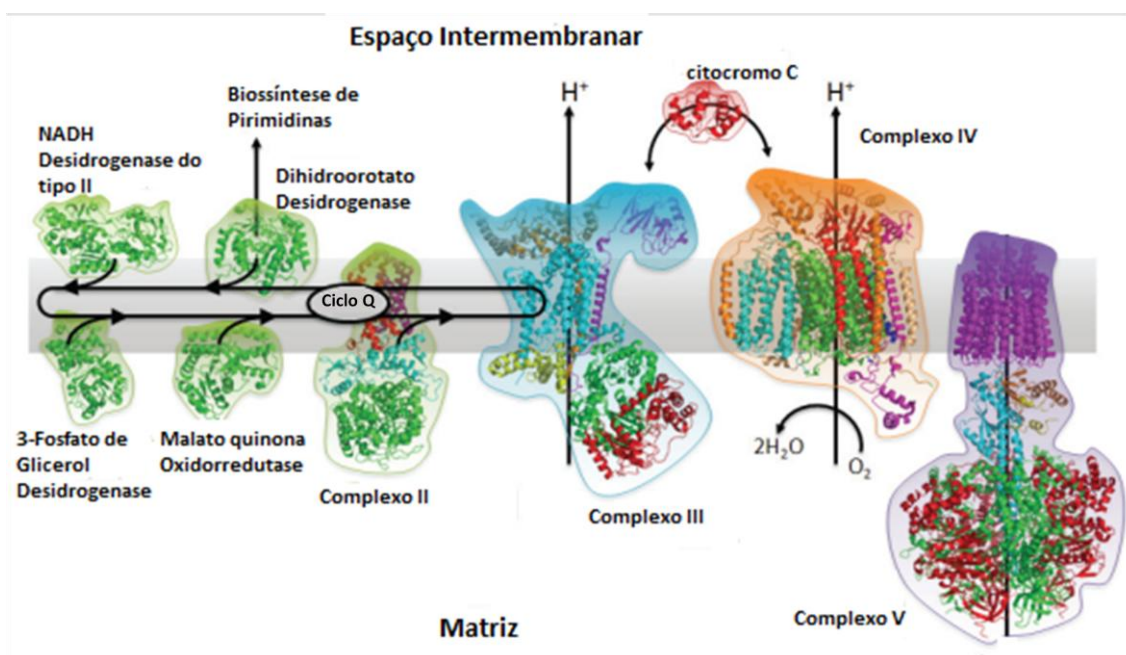
Os parasitas *Plasmodium* utilizam a glicólise e não a cadeia transportadora de electrões mitocondrial para sintetizar adenosina trifosfato (ATP). Estes protozoários têm uma única mitocôndria no seu citoplasma que é a fonte de succinil Coenzima A (Succinil CoA)

indispensável à biossíntese do heme e de orotato. A mitocôndria assegura ainda o transporte de pequenas moléculas e proteínas pela membrana interna mitocondrial. [14, 15, 16]

### 1.1.3.1 Cadeia de Transporte Eletrônico Mitocondrial

Julga-se que a cadeia de transporte electrónico dos parasitas *Plasmodium* (**Figura 5**) tenha tal como a dos mamíferos cinco complexos respiratórios: complexo I pertencente à classe II dos enzimas NADH desidrogenase, complexo II que é constituído pelo enzima succinato desidrogenase, complexo III ou complexo citocromo bc1 que é o responsável por gerar ubiquinona oxidada imprescindível à actividade de muitos desidrogenases mitocondriais, complexo IV que é constituído pelo citocromo c oxidase e o complexo V. [14, 15, 16, 17]

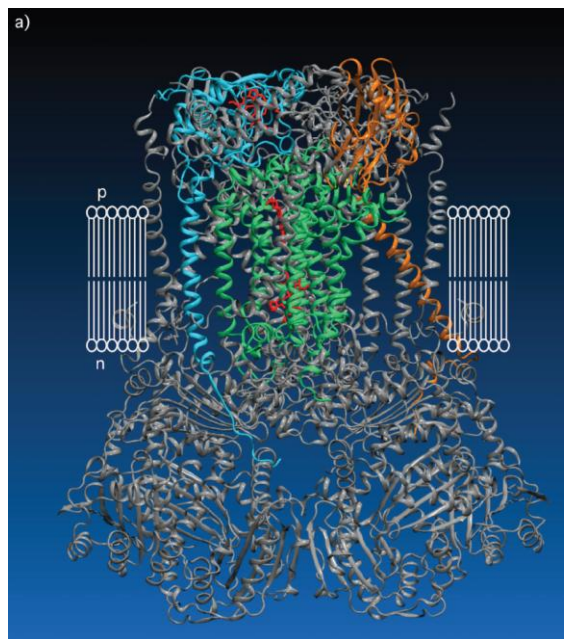
Os desidrogenases que constituem os complexos I e II bem como o glicerol-3-fosfato desidrogenase, o malato-quinona oxidoredutase e o dihidroorotato desidrogenase transportam, via citocromo c, electrões para os complexos III e IV. [16, 18]



**Figura 65** - Cadeia transportadora de Electrões na membrna mitocondrial dos parasitas *Plasmodium*. Adaptado de 18.

### 1.1.3.1.1. Complexo III - Citocromo bc1 ou ubiquinol: citocromo c oxidorreduase

O núcleo catalítico do complexo bc1 é composto por três subunidades que asseguram o transporte de electrões: citocromo b, citocromo c1 e a proteína de ferro-enxofre de Rieske (Figura 6).



**Figura 66** – Estrutura do Complexo citocromo bc1 da levedura, homólogo ao dos parasitas *PLasmodium*. O citocromo b está representado a verde, o citocromo c a azul e a proteína de Rieske a laranja. p e n referem-se aos lados positivo e negativo da membrana interna mitocondrial. Figura adaptada de 18.

O mecanismo catalítico do complexo ubiquinol: citocromo c oxidorreduase é descrito pelo ciclo Q, isto é, existem dois locais distintos de ligação às quinonas (o sítio de oxidação do quinol -  $Q_0$  - e o local de redução da quinona -  $Q_i$  -) localizados em lados opostos da membrana que estão ligados pelo citocromo b.

O ubiquinol produzido pelas desidrogenases liga-se ao local  $Q_0$  e é oxidado, libertando dois prótons e dois electrões. Numa reacção bifurcada, um electrão reduz a proteína de Rieske e o outro reduz o citocromo b que é depois oxidado, reciclando o electrão e conservando a energia pela redução da ubiquinona a ubiquinol no local  $Q_i$ . A proteína de ferro-enxofre de Rieske reduzida sofre uma alteração conformacional que permite o contacto próximo do seu domínio citoplasmático com o citocromo c1, ocorrendo transferência de um electrão. O citocromo c1 reduzido é oxidado pelo citocromo c solúvel, o dador de electrões do citocromo c oxidase (Complexo IV). Dois prótons são translocados do lado negativo para o positivo da membrana mitocondrial por cada molécula de quinol oxidada no  $Q_0$ .



## 1.2. Quimioterapia para a malária

Actualmente existe uma panóplia de fármacos (**Tabela 1**), pertencentes a diversas classes químicas, que podem ser usados para tratar a patologia.

**Tabela 3** – Principais fármacos existentes no mercado que se destinam ao tratamento da malária.

Principais Antimaláricos	
Família Química	Fármacos
4-Aminoquinolinas	Cloroquina, Amodiaquina, Piperaquina
Amino-álcoois	Quinino, quinidina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina
Sulfonamidas e sulfonas	Sulfadoxina, sulfaleno, dapsona
Biguanidos	Proguanil, Cloroproguanil
Diaminopirimidinas	Pirimetamina
8-Aminoquinolinas	Primaquina
Lactonas sesquiterpénicas	Artemisinina, artemeter, arteeter, artesunato, dihidroartemisinina
Naftoquinonas	Atovaquona
Antibióticos	Azitromicina, clindamicina, doxiciclina, tetraciclina

Os fármacos antimaláricos têm designações diferentes consoante a fase do ciclo de vida dos parasitas em que actuam. Por exemplo, aqueles que exercem a sua acção antimalárica contra as formas tecidulares dos parasitas *Plasmodium* que se desenvolvem no fígado, como a primaquina, são designados por **esquizontocidas tecidulares**. Já os **esquizontocidas sanguíneos** contemplam todos os antimaláricos que são activos nas formas eritrocíticas do parasita e são muito importantes na quimioterapia da malária dada esta ser a fase sintomática da doença. Fármacos como a cloroquina, o quinino, a mefloquina, a halofantrina, a pirimetamina, a sulfadoxina, as sulfonas, a artemisinina e as tetraciclins exibem este tipo de acção. Os fármacos que são activos nas formas sexuais sanguíneas do parasita e que previnem a transmissão da infecção ao mosquito, como a primaquina, são denominados **gametocitocidas**. Os **esporontocidas** englobam todas as moléculas que à semelhança da



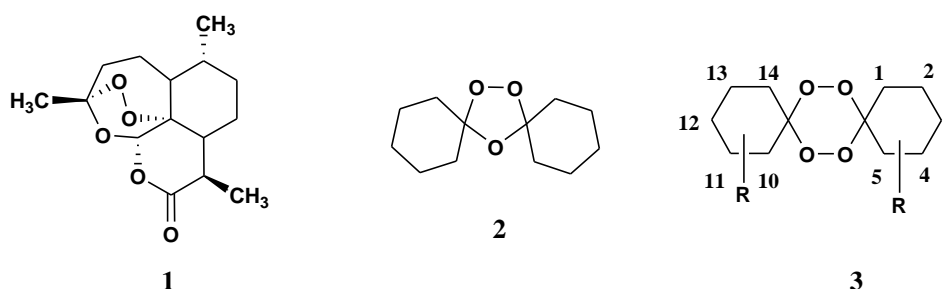
primaquina e do cloroguanido previnem o desenvolvimento de oocistos no mosquito e a subsequente transmissão da infecção.

O tratamento ideal para a eliminação da malária deve incluir um esquizontocida sanguíneo, um gametocida e um esquizontocida tecidual. [7, 20]

Para além da quimioterapia também redes tratadas com insecticidas e *sprays* para o interior das habitações estão disponíveis para o controlo da infecção. [3, 7]

### 1.2.1. Endoperóxidos – Tetraoxanos

A descoberta das propriedades antimaláricas da artemisinina (ART) (**1**, Figura 8), o princípio activo da *Artemisia annua*, e a identificação do seu farmacóforo, o 1,2,4-trioxano, deu início à exploração de novas abordagens no combate à doença. Assim, desde os anos 80 do século XX que os químicos medicinais começaram a desenvolver e testar centenas de peróxidos sintéticos e semi-sintéticos para avaliar a sua actividade antimalárica. Alguns dos compostos mais promissores que emergiram destes estudos foram os 1,2,4-trioxolanos (**2**, Figura 8) e os 1,2,4,5-tetraoxanos (**3**, Figura 8). [10, 13, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27]

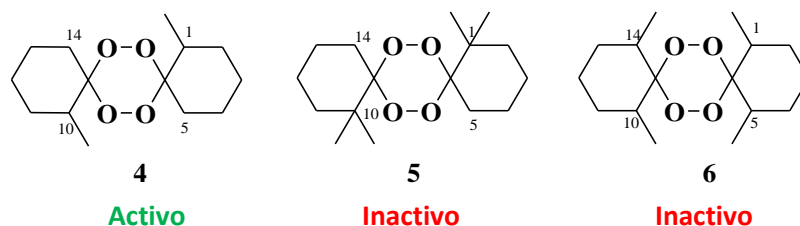


**Figura 68** – Estrutura química geral da Artemisinina (**1**), 1,2,4-Trioxolano (**2**) e 1,2,4,5-Tetraoxano (**3**). Adaptado de 10.

#### 1.2.1.1. Relações Estrutura – Actividade

Os tetraoxanos com grupos alquílicos equatoriais nas posições 1 e 10 (**4**, Figura 9) são compostos que apresentam impedimento estérico na ligação peroxídica e boa actividade antimalárica *in vivo*. A lipofilia dos tetraoxanos aumenta a sua potência, contudo, os tetrametiltetraoxanos (**5**, Figura 9 e **6**, Figura 9) apresentam um impedimento estérico elevado o que previne a sua activação a radicais pela inibição da transferência electrónica do heme ou outras espécies de ferro (II), sendo por isso inactivos. [10, 22]

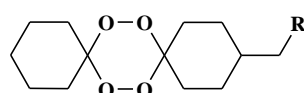




**Figura 69** – Efeito do impedimento estéreo da ligação peroxidica na actividade do composto. Adaptado de 13.

Tetraoxanos substituídos com grupos aceitadores de ligações de hidrogénio têm, geralmente, actividade superior face a tetraoxanos substituídos com grupos dadores de ligações de hidrogénio. Estudos de *docking* sugerem que a proximidade do ferro (II) e do átomo de oxigénio do tetraoxano favorecem a actividade potente deste tipo de compostos, sendo que a transferência de electrões da ligação peroxidica dos tetraoxanos é crucial para o mecanismo de acção.<sup>[22]</sup>

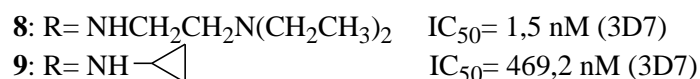
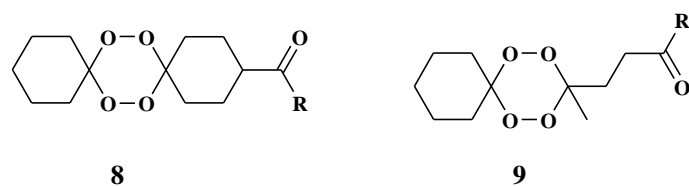
Tetraoxanos mistos com grupos polares neutros ou básicos têm sido sintetizados com o objectivo de obter estruturas anfífilas simples nas quais existe pouca influência do impedimento estéreo dos substituintes na actividade antimalárica. Independentemente da presença de grupos neutros (**7a**, Figura 10), polares próticos (**7b**, Figura 10) ou grupos básicos ionizáveis (**7c**, Figura 10) os tetraoxanos apresentaram actividade antimalárica semelhante o que impossibilita estudos da relação estrutura – actividade (SAR) profundos.<sup>[13]</sup>



<b>7a:</b> R= N <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub> = 9,87 nM (D6)
<b>7b:</b> R= OH	IC <sub>50</sub> = 11,24 nM (D6)
<b>7c:</b> R= NH <sub>i</sub> Pr	IC <sub>50</sub> = 9,40 nM (D6)

**Figura 70** – Estrutura e Actividade antimalárica dos compostos 7 na estirpe D6 do *P. falciparum*. Adaptado de 13.

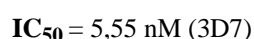
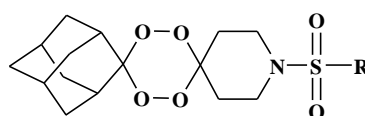
Estudos posteriores revelaram que grupos funcionais como alcenos, alcinos e éteres permitiam obter tetraoxanos mais potentes do que aqueles que incluem as funcionalidades álcool ou ácido carboxílico.<sup>[10]</sup> Também os 3,6-dispiro-1,2,4,5-tetraoxano (**8**, Figura 11) apresentam actividade antimalárica muito superior aos monospiro tetraoxanos (**9**, Figura 11).



**Figura 71** – Estrutura e Actividade dos dispiro tetraoxanos (8) e monospiro (9) na estirpe 3D7 do *P. falciparum*. Adaptado de 13.

Além disso, os dispiro-tetraoxanos que incorporam um grupo adamantilo apresentam maior estabilidade ao nível da ligação peroxídica, visto a funcionalidade adamantil ser metabolicamente estável. Este tipo de compostos apresentam actividades na ordem dos 3 a 30 nM na estirpe 3D7 do *P. falciparum*, sendo necessárias doses de cerca de 30 mg/kg *per os* para obter 100% de inibição da infecção em ratinhos. <sup>[10, 13, 29]</sup>

Os tetraoxanos que contêm grupos sulfonamidas polares num terminal e um grupo lipofílico como o adamantilo na outra extremidade dão origem aos derivados mais activos (**Figura 12**).<sup>[13]</sup>

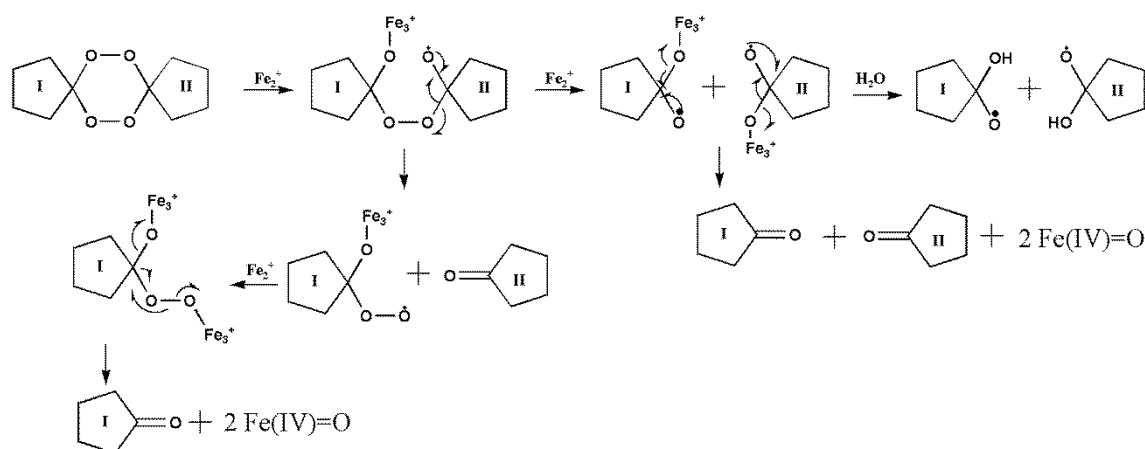


**Figura 72** - Estrutura e Actividade dos tetraoxanos que contêm um grupo polar e um grupo lipofílico. Adaptado de 13.

### 1.2.1.2. Mecanismo de Acção

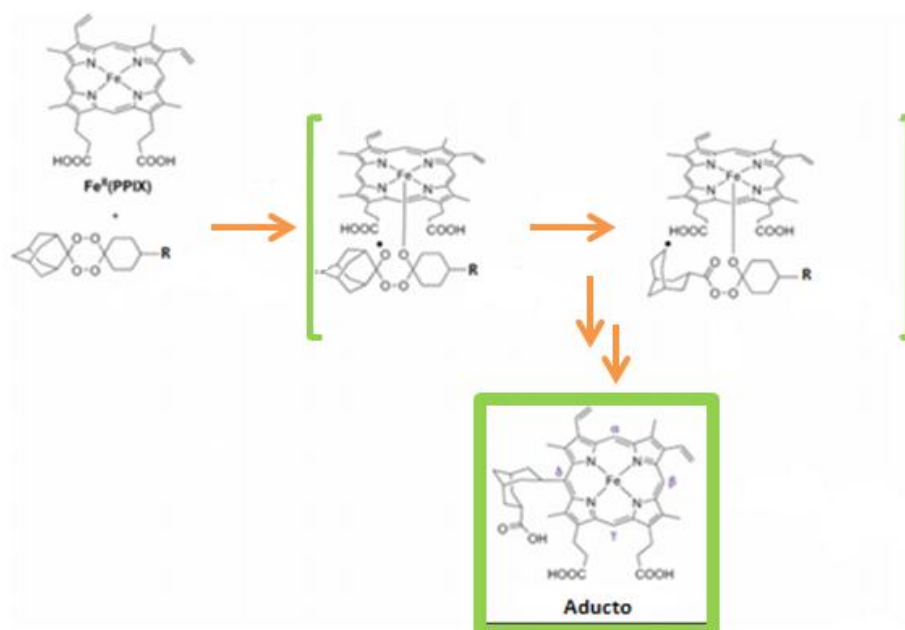
Estudos efectuados com 1,2,4,5-tetraoxanos conjugados com fluorocromos revelaram que estes compostos se acumulam nos eritrócitos infectados, no interior do citoplasma ou no vacúolo digestivo do parasita. Os antimaláricos peroxídicos matam os parasitas *Plasmodium* através da cisão da ligação peroxídica induzida pelo ferro livre no citoplasma ou ligado ao heme. A coordenação do ferro com o oxigénio da ligação peroxídica do tetraoxano que

apresenta menor impedimento estérico leva à formação de radicais oxilo que sofrem um rearranjo em radicais centrados no carbono (**Figura 13**).



**Figura 73** - Mecanismo proposto para a decomposição dos tetraoxanos induzida pelo ferro no estado de oxidação II com formação das espécies intermediárias  $\text{Fe(IV)=O}$ . Adaptado de 13 e 30.

Os radicais centrados no carbono podem reagir com biomoléculas ou alquilar o heme, formando aductos heme-fármaco capazes de interferir com a formação da Hz (**Figura 14**). Os aductos do heme podem ainda causar danos membranares ou inibir competitivamente outras proteínas parasitárias que interajam com o heme. Também os radicais  $\text{RO}^\cdot$  e as espécies  $\text{Fe(IV)=O}$  são capazes de provocar hidroperoxidação membranares dos eritrócitos, vacúolo digestivo ou de outras biomoléculas. [13, 24, 27, 28, 29, 30, 31]



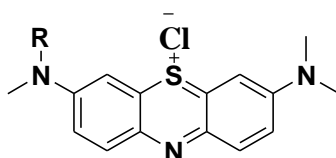
**Figura 74** - Mecanismo proposto para a formação de aductos heme-tetraoxano. Adaptado de 30.

### 1.2.1.3. Toxicidade

A ponte peroxidica é essencial para a actividade antimalárica dos tetraoxanos, contudo, ainda se sabe pouco acerca do potencial destes compostos para causar embriotoxicidade ou neurotoxicidade. Atendendo aos estudos efectuados estes antimaláricos promissores apresentam excelentes índices terapêuticos. <sup>[23, 25]</sup>

### 1.2.2. 8-Aminoquinolinas – Primaquina

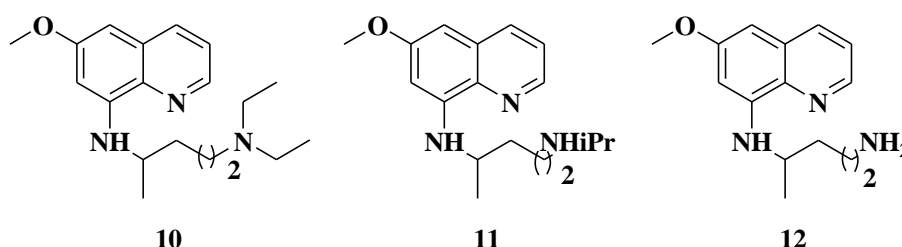
Em 1891, Paul Ehrlich observou a acumulação selectiva do químico azul de metileno (**Figura 15**) nos parasitas *Plasmodium* e usou este composto para tratar com sucesso duas pessoas infectadas com malária.



**Figura 75** – Estrutura química do corante azul de metileno. Adaptado de 11.

Nos anos posteriores, químicos alemães fizeram algumas modificações na estrutura do azul de metileno e em 1925 através da substituição de um dos grupos metilo do composto por uma cadeia lateral dialquilaminoalquílica conseguiram obter a primeira 8-aminoquinolina (8-AQ) com elevada actividade esquizontocida, a pamaquina ou plasmoquina (**10**, Figura 16).

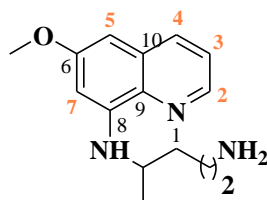
Esta 8-AQ foi o primeiro fármaco capaz de prevenir um novo surto de malária em doentes infectados com o *P.vivax*, no entanto, era pouco eficaz na fase sanguínea da doença. A pamaquina acabou por ser abandonada por razões toxicológicas e na tentativa de ultrapassar essas limitações, 8-AQ como a pentaquina (**11**, Figura 16) e a primaquina (**12**, Figura 16) foram sintetizadas nos anos 40 do século XX. De entre os compostos obtidos a primaquina foi a molécula que apresentava melhor índice terapêutico. <sup>[11, 32, 33]</sup>



**Figura 76** – Estrutura química dos fármacos pamaquina (**10**), pentaquina (**11**) e primaquina (**12**). Adaptado de 11 e 33.

### 1.2.2.1. Relações Estrutura – Actividade

Nas últimas seis décadas a estrutura da primaquina tem sido fortemente modificada, no sentido de se aumentar não só a sua eficácia terapêutica mas também reduzir a sua toxicidade. Assim, introduziram-se substituintes nas posições 2, 3, 4, 5 e 7 do anel quinolínico (**Figura 17**).



**Figura 77** – Representação das posições do anel quinolínico da primaquina que foram alvo de modificações (números a laranja).

A presença de um grupo metilo ou etilo nas posições 2 e 4, uma ramificação *tert*-butilo na posição 2, um substituinte fenoxilo na posição 5 ou um grupo alcóxilo ou flúor nas posições 3 e

4 permitem obter derivados com maior actividade. No entanto, a introdução de substituintes nas posições 2 e 3 origina compostos menos activos e menos tóxicos que a primaquina.

O anel quinolínico não parece ser essencial para a actividade antimalárica da primaquina, dado que, a sua substituição por anéis de naftaleno ou naftopiridinas origina compostos igualmente activos. O anel de naftopiridina tem elevado potencial oxidativo devido à presença de um segundo átomo de azoto no sistema aromático. Tal pode prevenir a hidroxilação da posição C5 responsável pela reactividade química e metabolitos potencialmente tóxicos da primaquina.

A introdução de substituintes com um átomo de oxigénio, como o fenoxilo ou de grupos fenilsulfanilo ou anilina na posição 5 do anel quinolínico permite obter derivados com actividade potente e toxicidade reduzida.

A presença de uma função oxigénio na posição 6 tem demonstrado um aumento da actividade da primaquina, assim o grupo metoxilo na posição 6 está presente em praticamente todos os derivados sintetizados.

Compostos que tenham substituintes na posição 7 da quinolina são geralmente inactivos.

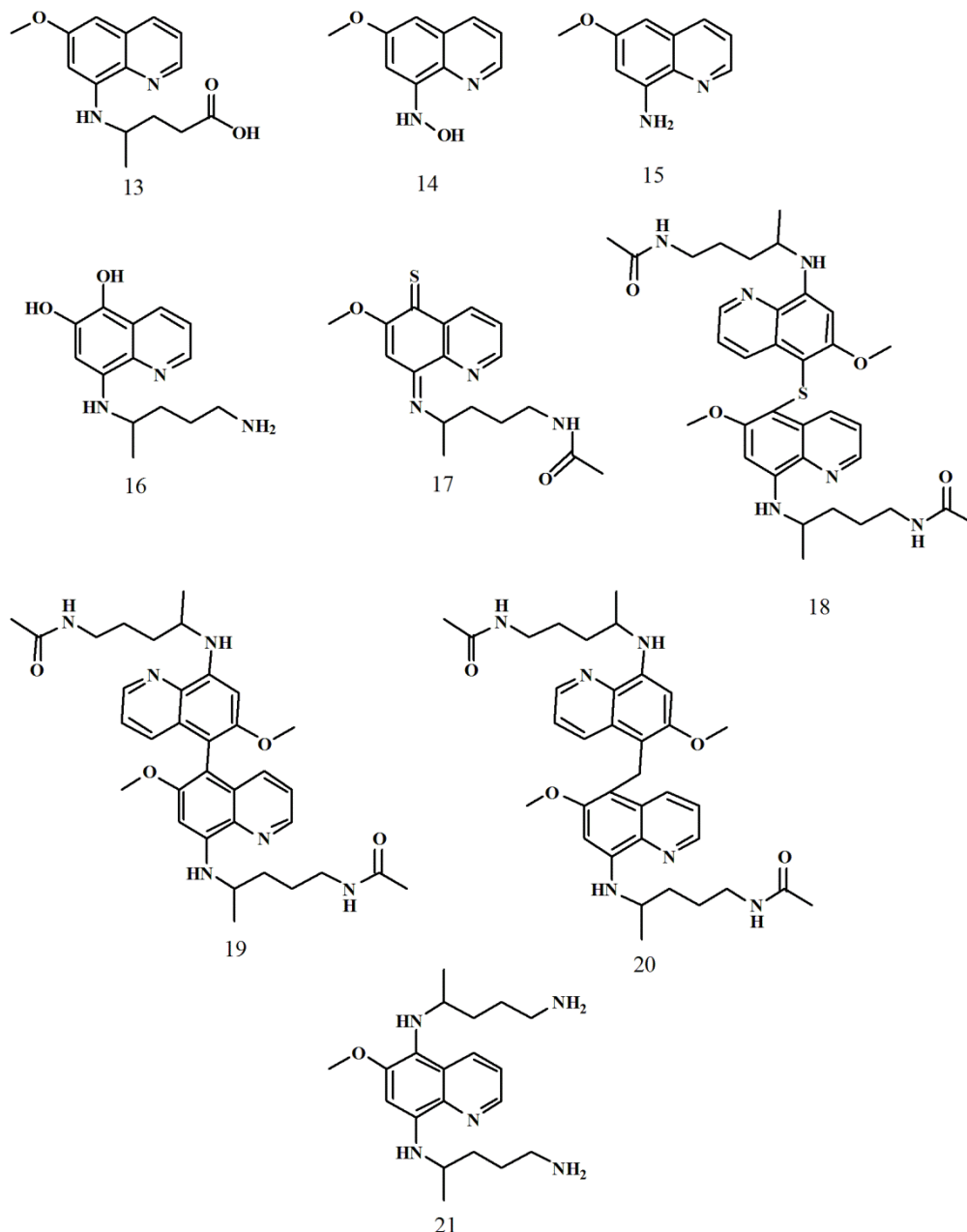
A presença de um grupo amina terminal na primaquina é essencial para a actividade gametocida e o seu bloqueio permite aumentar a biodisponibilidade deste fármaco dado que reduz as posições susceptíveis de serem metabolizadas. Já o grupo amina na posição 8 do anel quinolínico deve ser secundário. Os dois azotos da cadeia lateral devem estar separados por cerca de 2 a 6 grupos metileno, sendo que um número par de grupos metileno leva a compostos ligeiramente menos activos. [11, 31, 32, 33, 34]

### 1.2.2.2. Metabolismo

A primaquina é rapidamente absorvida no tracto gastro-intestinal e concentra-se no fígado, cérebro, coração, pulmões e músculo esquelético atingindo o pico de concentração no plasma cerca de 1 – 3h após ingestão.

O composto é extensamente metabolizado, o seu tempo de meia-vida varia entre as 4h e as 9h e apenas 1-4% da dose é eliminada como primaquina na urina. Desta forma, pensa-se que a primaquina não seja a forma activa da molécula até porque alguns dos seus metabolitos e derivados apresentam uma actividade superior. [31, 34] Estudos efectuados com microssomas hepáticos humanos revelaram que as isoformas CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 e CYP2E1 do citocromo P450 (CYP450) são as responsáveis pelo metabolismo da primaquina e há ainda dados que sugerem a inibição dos CYPs 1A2, 2D6 e 3A4 e a indução do CYP1A2 pelo composto.

A metabolização da primaquina dá origem a compostos como a carboxiprimaquina (**13**, Figura 18), espécies N-hidroxiladas (**14**, Figura 18), 6-metoxi-8-aminoquinolinas (**15**, Figura 18), 5-hidroxiprimaquina (**16**, Figura 18), espécies sulfuradas (**17 - 18**, Figura 18), estruturas diméricas (**19 - 20**, Figura 18) e outros metabolitos (**21**, Figura 18).



**Figura 78** – Estrutura química dos principais metabolitos da primaquina. Adaptado de 30, 31, 32.

A carboxiprimaquina (**13**, Figura 18) é a forma predominante da primaquina em circulação no plasma após administração oral no Homem e resulta do metabolismo do composto pelo citocromo P450 (CYP 450) e pela isoforma A do enzima mitocondrial monoamina oxidase (MAO). O CYP450 converte a primaquina a carboxiprimaquina através de um processo de

desaminação oxidativa e o MAO catalisa a conversão da primaquina a um derivado aldeído que é posteriormente oxidado por desidrogenases a carboxiprimaquina. Este metabolito exhibe menor toxicidade e menor actividade esquizontocida que a primaquina, o que sugere que um grupo amina ionizável na parte alifática é essencial para a actividade do composto. [33, 34, 35, 36, 37]

### 1.2.2.3. Mecanismo de Acção

A primaquina (**12**, Figura 16) é o único medicamento em uso clínico que tem elevada actividade gametocitocida contra todas as espécies de *Plasmodium* que infectam humanos pelo que impede a disseminação da patologia. Esta actua ainda como esquizontocida tecidular capaz de eliminar as formas primárias e secundárias hepáticas e é único fármaco que cura totalmente a malária em indivíduos infectados com os *P. vivax* e *P. ovale*, pois consegue eliminar os hipnozoítos. [5, 20, 32, 33, 35]

Sabe-se que as 4-aminoquinolinas se acumulam nos eritrócitos infetados, no interior do vacúolo digestivo ácido do parasita devido aos grupos básicos na cadeia lateral que ficam ionizados. A cadeia lateral aminoalquilica destes compostos tem ainda um papel essencial na inibição da formação da  $\beta$ -hematina. No entanto, o papel das cadeias laterais aminoalquílicas básicas nas 8-AQ na inibição da  $\beta$ -hematina é ainda uma área inexplorada. [9, 10]

O mecanismo exacto pelo qual a primaquina actua ainda é desconhecido mas, pensa-se que o metabolismo mitocondrial do parasita seja afectado, eventualmente pela interferência deste fármaco com o transporte de electrões pela ubiquinona, na cadeia respiratória mitocondrial.

A primaquina pode ainda actuar pela estimulação da produção de metabolitos altamente reactivos com elevado poder oxidativo intracelular, como as espécies reactivas de oxigénio (radical anião superóxido, radical hidroxilo e peróxido de hidrogénio). A falta de mecanismos bioquímicos no parasita para competir com o stress oxidativo podem explicar a baixa resistência do mesmo à primaquina.

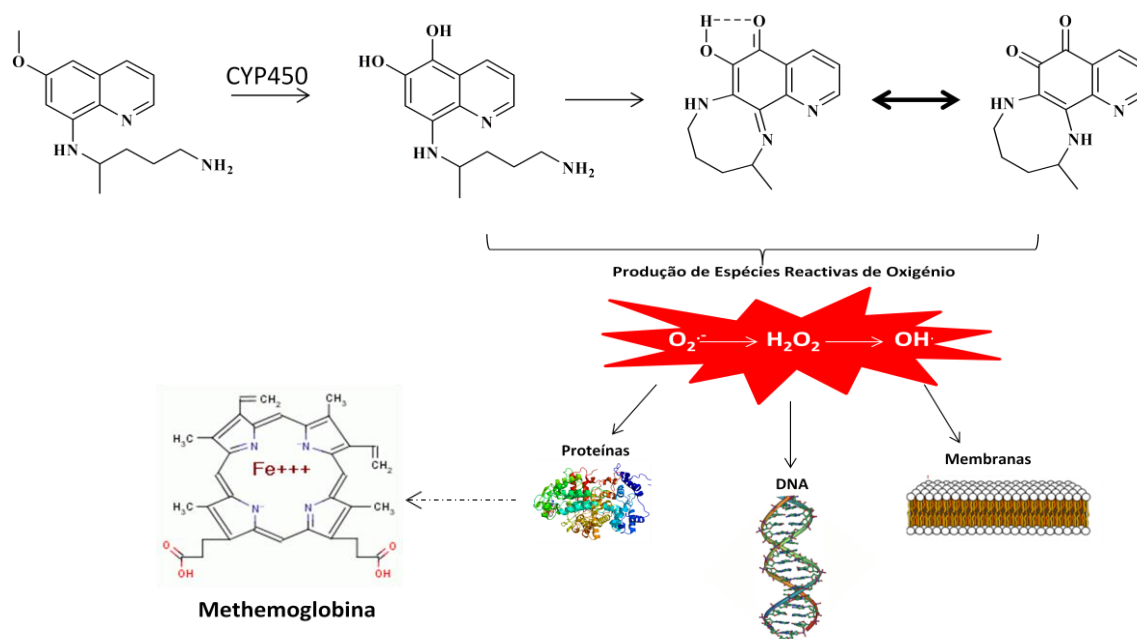
A geração selectiva de stress oxidativo nas células infectadas com parasitas parece ser o mecanismo mais provável para a toxicidade e eficácia destes compostos. [36, 37]

### 1.2.2.4. Toxicidade

Um mecanismo similar ao que é responsável pela actividade da primaquina desencadeia também a sua toxicidade. [30, 32] O stress oxidativo intra-eritrócítico mediado pelos metabolitos com elevado poder oxidante como a 5-hidroxiprimaquina (5-HPQ) (**16**, Figura 18), gera espécies electrofílicas como as quinoniminas e espécies com elevado poder oxidante como o



radical anião superóxido ou o peróxido de hidrogénio. Estas são capazes de induzir peroxidação lipídica e alterações da assimetria da fosfatidilserina. O elevado stress oxidativo associado a estes processos provoca a redução da glutatona e a auto-oxidação do núcleo de ferro da hemoglobina com formação de methemoglobina (**Figura 19**).



**Figura 79** – Representação esquemática do mecanismo de toxicidade da primaquina.

A methemoglobina acumula-se no corpo e compromete a oxigenação dos tecidos. Além do oxigénio não se conseguir ligar à forma oxidada do heme, quando uma ou mais subunidades da hemoglobina têm o seu heme oxidado ou ligado ao monóxido de carbono (CO), a estrutura quaternária da proteína é alterada e a afinidade dos restantes hemes não oxidados para o oxigénio aumenta, implicando uma dissociação menos favorável. Desta forma, o uso da primaquina está associado a condições patológicas como a anemia hemolítica e a methemoglobinemia com subsequente cianose. [31, 32, 33]

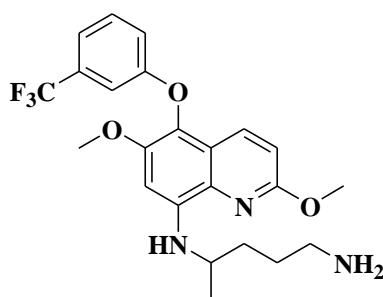
A baixa biodisponibilidade oral da primaquina requer administrações repetidas de doses altas que acabam por potenciar o aparecimento dos efeitos secundários nefastos.

A toxicidade deste fármaco é agravada nas pessoas com uma deficiência genética no enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (6PGD), uma característica comum na população Africana. Tal ocorre porque uma deficiência neste enzima interfere com a produção de equivalentes redutores necessários à actividade do enzima glutatona redutase que reduz a glutatona.

Pessoas com deficiência no enzima NADH methemoglobina redutase, uma deficiência muito rara, são também extremamente sensíveis a fármacos que oxidam a hemoglobina como a primaquina. [5, 32, 33, 34, 35]

A primaquina não é o fármaco antimalárico com o melhor perfil terapêutico mas é o único antimalárico que bloqueia a transmissão e que tem actividade nos hipnozoítos. Esta continua a ser usada como ponto de partida para o desenvolvimento de novos antimaláricos mais potentes e menos tóxicos. Na tentativa de ultrapassar os problemas de toxicidade associados à primaquina já se sintetizaram derivados com péptidos e aminoácidos, contudo, estes são rapidamente hidrolisados por endopeptidases e aminopeptidases ao composto mãe.

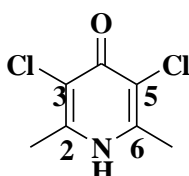
Actualmente, existe um fármaco alternativo à primaquina, a tafenoquina (**Figura 20**), que está em ensaios clínicos de fases II/III. [5, 32, 37, 38]



**Figura 80** - Estrutura química da Tafenoquina.

### 1.2.3. Piridonas

As propriedades antimaláricas das piridonas foram conhecidas em 1960 quando se submeteu o fármaco clopidol (**Figura 21**) a testes em estirpes do parasita *P. falciparum* resistentes à cloroquina. [19, 39, 40]



**Figura 81** - Estrutura química do fármaco Clopidol.

### 1.2.3.1. Mecanismo de Acção

Os derivados das piridonas ligam-se ao local Q<sub>0</sub> do complexo bc<sub>1</sub> da cadeia respiratória mitocondrial e actuam como inibidores potentes e selectivos da cadeia de transporte de electrões dos parasitas do género *Plasmodium*.<sup>[17, 19, 39]</sup> Dado que a cadeia respiratória mitocondrial destes parasitas difere do sistema análogo dos mamíferos todos os derivados das piridonas são selectivos para o parasita.<sup>[39, 40, 41, 42]</sup>

### 1.2.3.2. Relações Estrutura – Actividade

As propriedades físico-químicas e o perfil farmacocinético das 4-piridonas podem ser melhorados através de algumas transformações químicas no anel da piridona.

A introdução de aminas terciárias ionizáveis, ésteres, ácidos carboxílicos e grupos amida na posição C3 não é bem tolerada. Já o grupo CH<sub>2</sub>OH induz uma queda na actividade quando é inserido na posição C2, no entanto, na posição C6 permite obter derivados potentes com melhores propriedades farmacocinéticas e de solubilidade.<sup>[40]</sup> Julga-se que a posição C5 do anel da piridona esteja próxima de um canal hidrofóbico do citocromo que contém aminoácidos com cadeias laterais aromáticas e alifáticas, desta forma, a introdução de cadeias lipofílicas ou cadeias laterais trans-(4- clorofenilo) ciclohexilo ou fenoxiarilo nesta posição é bem tolerada e permite obter compostos com maior actividade antimalárica.<sup>[19, 41, 42, 43, 44]</sup>

## 1.3. Complicações da Malária

Caso a malária não seja tratada os doentes podem desenvolver complicações neurológicas graves como a malária cerebral. Esta é uma síndrome clínica caracterizada por coma e pode levar à morte ou ao desenvolvimento de lesões cerebrais, que se manifestam como danos neuro-cognitivos a longo prazo.

Pensa-se que a malária cerebral seja causada pela presença de eritrócitos infectados com parasitas na micro-circulação do cérebro. Estes acabam por induzir mudanças patofisiológicas nos tecidos próximos e causar disfunção neuronal.

Quando os eritrócitos infectados chegam ao cérebro, as proteínas derivadas do parasita estão na superfície do eritrócito, tal causa a sequestração dos eritrócitos no endotélio, pelo que ao longo do tempo a massa de parasitas sequestrados aumenta e acaba por formar rosetas com os eritrócitos não parasitados e/ou plaquetas para se ligar a eles. Esta sequestração provoca danos na perfusão cerebral e pode agravar o coma através da hipoxia.<sup>[45]</sup>

## 1.4. Resistência à Quimioterapia

Ao longo do tempo, os parasitas foram sofrendo mutações que lhes conferiam maior sobrevivência na presença de um determinado fármaco, desta forma, os parasitas mutados foram selecionados, o que resultou numa população parasitária que já não é sensível a uma determinada molécula. Assim, apesar de se conhecerem diferentes fármacos para a malária com múltiplos alvos, não existem muitas opções terapêuticas disponíveis dado que a maioria das moléculas se tornaram compostos inactivos.<sup>[7, 36]</sup> Além disso, grande parte dos fármacos actualmente disponíveis tem tempos de meia-vida longos pelo que quando são usados repetidamente numa zona endémica de malária, uma proporção significativa da comunidade tem diferentes concentrações dos fármacos no corpo, o que acaba por funcionar como um filtro favorável ao estabelecimento de infecções por estirpes resistentes.<sup>[46]</sup>

Apesar da natureza aleatória da emergência de resistência aos fármacos, monitorizar a qualidade do fármaco e o tratamento podem prevenir a emergência da resistência.

Dado haverem relatos de diminuição da sensibilidade dos parasitas à ART, a molécula cujas propriedades antimaláricas foram mais recentemente conhecidas, a organização mundial de saúde (OMS) recomenda o uso de terapias de combinação baseadas na artemisinina (ACT). Este tipo de tratamento deve incluir um antimalário de acção prolongada para reduzir a transmissão e ao mesmo tempo proteger os derivados da ART que têm uma acção rápida na redução da carga parasitária.<sup>[7, 33, 47]</sup>

## 1.5. Fármacos Híbridos

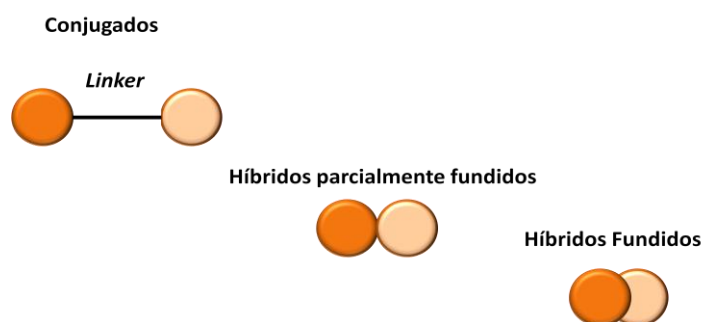
A batalha contra a malária, nos tempos mais próximos, vai certamente depender da quimioterapia disponível e tendo em conta que muitos dos fármacos do passado já se revelaram compostos inactivos devido ao desenvolvimento de resistência, a OMS defende que todos os tratamentos devem ser combinação de dois ou mais fármacos.<sup>[4]</sup> Assim, uma nova abordagem no tratamento da malária é utilizar moléculas híbridas, ou seja, moléculas que resultam da ligação covalente de dois farmacóforos químicos distintos.<sup>[48]</sup>

Os compostos híbridos não devem ser mais dispendiosos dado que os riscos e custos envolvidos não devem diferir dos usados no estudo de uma única entidade. Visto nas moléculas híbridas os dois compostos bioactivos estarem ligados numa única molécula, as interacções adversas fármaco-fármaco serão menores. Uma vez que neste tipo de compostos nenhum dos farmacóforos é exposto a elevadas cargas parasitárias como monoterapia, a possibilidade dos parasitas desenvolverem resistência é menor. Além disso, dado que os

doentes têm de tomar apenas um único medicamento a *compliance* é grandemente aumentada. [5, 21, 33, 46]

Dependendo da forma como os farmacóforos são ligados, os híbridos podem ser classificados em quatro grupos distintos (**Figura 22**):

1. **Conjugados** – incluem todos os compostos nos quais as partes da molécula que contêm os farmacóforos para cada alvo estão separados por um grupo *linker* diferente que não faz parte de nenhum fármaco e é metabolicamente estável;
2. **Conjugados hidrolisáveis** – dizem respeito às moléculas que têm um *linker* cuja metabolização resulta na libertação dos fármacos que posteriormente interagem de forma independente com o alvo;
3. **Híbridos parcialmente fundidos** – englobam as moléculas que têm um *linker* muito pequeno e que, por isso, permitem o contacto dos dois farmacóforos;
4. **Híbridos fundidos** – reúnem as moléculas onde os dois compostos de partida foram ligados através de grupos funcionais presentes na sua estrutura. Este tipo de híbridos origina as moléculas mais simples e pequenas. [33, 46, 48, 49]



**Figura 82** – Representação esquemática dos tipos de moléculas híbridas. Adaptado de 49.

## 1.6. A genética e a malária

Alguns polimorfismos genéticos, especialmente aqueles que afectam os eritrócitos dão aos seus portadores a vantagem de serem menos susceptíveis aos efeitos da malária ou até à

contração da doença. No entanto, nenhuma condição genética protege os seus portadores da morte pela malária provocada pelo *P.falciparum*.

- Anormalidades nos genes que codificam a Hb (Talassemias) conferem aos seus portadores 50% menos risco de ter malária;
- Deficiências no enzima 6PGD condicionam a quimioterapia da malária mas também reduzem em 50% as possibilidades dos seus portadores serem infectados pelo *P.falciparum*;
- Mutações como a síntese da hemoglobina S conferem uma protecção de 90% da morte por malária. <sup>[1]</sup>

## 1.7. Âmbito da Tese

Actualmente, o controlo da malária é feito através de redes para camas tratadas com insecticidas, testes de diagnóstico rápidos, insecticidas em *spray* e terapias de combinação da artemisinina. Todas estas ferramentas contribuíram para a diminuição da mortalidade e morbilidade associadas à malária, contudo todas elas se revelam ineficazes na difícil tarefa de eliminação da doença.

Para erradicar a malária é necessário desenvolver novos insecticidas que ultrapassem os problemas de resistência associados aos mosquitos *Anopheles*, criar vacinas eficazes que protejam as crianças e encontrar novas alternativas à quimioterapia existente dado que os ciclos de resistência dos parasitas fazem com que a vida de um antimalárico varie entre vários anos e várias décadas. Os novos fármacos antimaláricos devem ainda eliminar as formas assexuais sanguíneas e matar os gametócitos que permitem a transmissão dos parasitas *Plasmodium*. [7, 11, 25]

Dado a OMS recomendar a combinação de dois ou mais agentes antimaláricos para prevenir o desenvolvimento de resistência, nos últimos anos através do desenho racional de fármacos, têm sido desenvolvidas moléculas híbridas com dupla funcionalidade e/ou alvos. Alguns destes híbridos têm demonstrado actividade potente e toxicidade mínima. [7, 17, 50, 51]

Os tetraoxanos (**3**, Figura 8) apresentam uma actividade esquizontocida sanguínea comparável à da artemisinina e são uma alternativa totalmente sintética e de baixo custo aos derivados deste produto natural. Apesar destes compostos serem capazes de eliminar rapidamente as formas sanguíneas dos parasitas da malária, os mesmos revelam-se inactivos na fase hepática da doença. [10, 13]

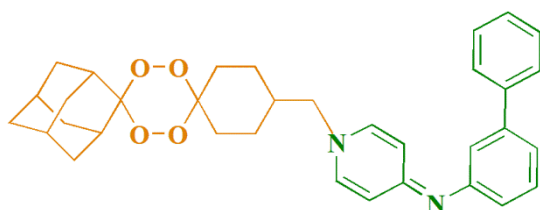
A primaquina (**12**, Figura 16) é um potente esquizontocida tecidular que elimina as formas primárias e secundárias hepáticas dos parasitas *Plasmodium* e é o único medicamento em uso clínico com elevada actividade gametocitocida contra todas as espécies de *Plasmodium* que infectam humanos, impedindo assim a disseminação da patologia. Este fármaco é ainda o único que cura totalmente a malária em indivíduos infectados com os *P. vivax* e *P. ovale*, pois consegue eliminar os hipnozoítos. No entanto, a primaquina é pouca activa nas formas sanguíneas do ciclo infeccioso. [5, 32, 33, 34, 35]

As piridonas (**Figura 21**) são inibidores potentes e selectivos da cadeia de transporte electrónico dos parasitas que se ligam ao local Q<sub>0</sub> do complexo bc1 da cadeia respiratória mitocondrial e demonstram actividade na fase hepática da malária. [19, 39, 40]

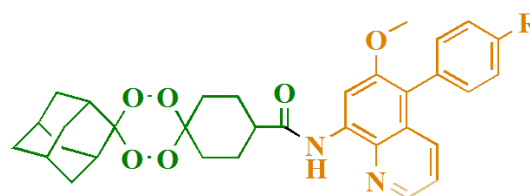
Desta forma, o objectivo deste trabalho foi desenvolver novas moléculas híbridas constituídas pelos farmacóforos 1,2,4,5-tetraoxano e piridonimina (**29a**), isómeros das piridonas, e peróxido e 8-AQ (**35a – d**). Com a síntese dos compostos **29** e **35** pretendia-se desenvolver novas moléculas híbridas com actividade tanto na fase sanguínea como na fase hepática do ciclo infeccioso do parasita da malária.

Os compostos **35** foram sintetizados sem a cadeia aminoalquílica presente nas 8-AQ com a finalidade de estudar o efeito da sua remoção na actividade. Para tentar obter compostos com maior estabilidade metabólica, introduziu-se um substituinte arilo na posição 5 do anel quinolínico dos compostos **35**.

Depois de obter os compostos **29a** e **35a – d**, avaliou-se a estabilidade enzimática dos compostos **35** em condições fisiológicas de pH e temperatura (tampão fosfato pH 7,4 e 37 °C) e em microsomas de fígado de rato. Os compostos foram também testados em modelos das fases hepática e sanguínea da malária.



Composto **29a**.



Compostos **35a – d**.



## Capítulo 2

# **Síntese de novos compostos híbridos**

## 2.1 Síntese dos compostos híbridos 1,2,4,5-tetraoxano-piridonimina

Tal como foi referido no capítulo 1, a descoberta da actividade antimalárica da artemisinina e a identificação do seu farmacóforo peroxídico levou à síntese e teste de vários compostos com grupos endoperóxido em modelos da malária. Uma das classes mais promissoras de compostos que emergiu destes estudos foram os 1,2,4,5-tetraoxanos, moléculas que exibem elevada actividade esquizontocida sanguínea. <sup>[10, 21, 22, 23, 24, 25]</sup>

As piridonas são moléculas que inibem de forma potente e selectiva a cadeia de transporte electrónico dos parasitas *Plasmodium*, dado que se ligam ao local Q<sub>0</sub> do complexo bc1 da cadeia respiratória mitocondrial. Uma substituição isostérica na estrutura das piridonas levou ao aparecimento de novos compostos com actividade antimalárica, as piridoniminas. <sup>[19, 39, 40]</sup>

Atendendo aos relatos existentes na literatura onde é referido que a combinação de duas moléculas com actividade antimalárica numa única entidade química pode potenciar a actividade de cada uma delas <sup>[50, 51]</sup>, neste trabalho começou-se por tentar sintetizar um novo composto híbrido tetraoxano-piridonimina. A sua retrosíntese é apresentada na **Figura 23** e evidencia a necessidade de sintetizar um tetraoxano com um bom grupo abandonante (**25**) capaz de reagir com o azoto do anel de piridina da aminopiridina (**28**). A síntese do tetraoxano com um bom grupo abandonante foi efectuada de acordo com as metodologias de Kumar *et al* <sup>[52]</sup>, Lombardo *et al* <sup>[53]</sup> e Shen *et al* <sup>[54]</sup>. O esquema reaccional e os intermediários envolvidos no processo sintético são apresentados no **Esquema 1**. Todas as vias sintéticas utilizadas bem como a identificação dos compostos sintetizados serão apresentadas neste capítulo.

## Esquema Retrossintético

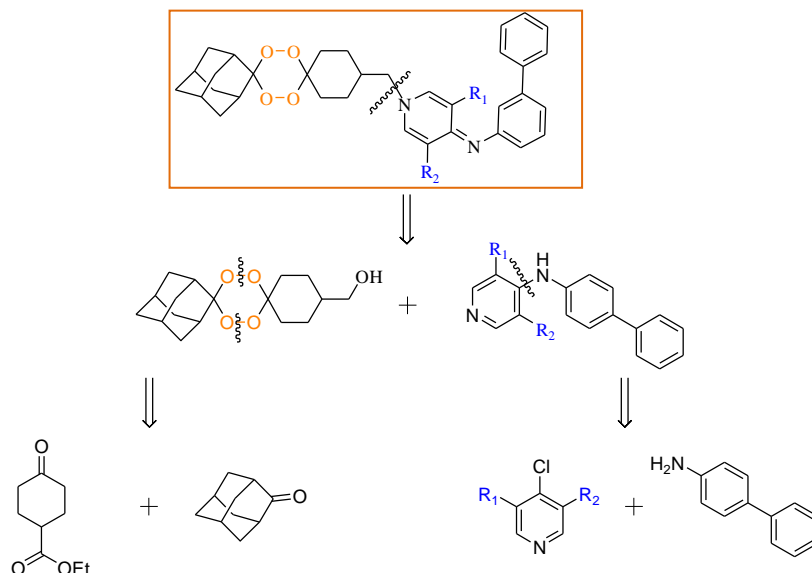
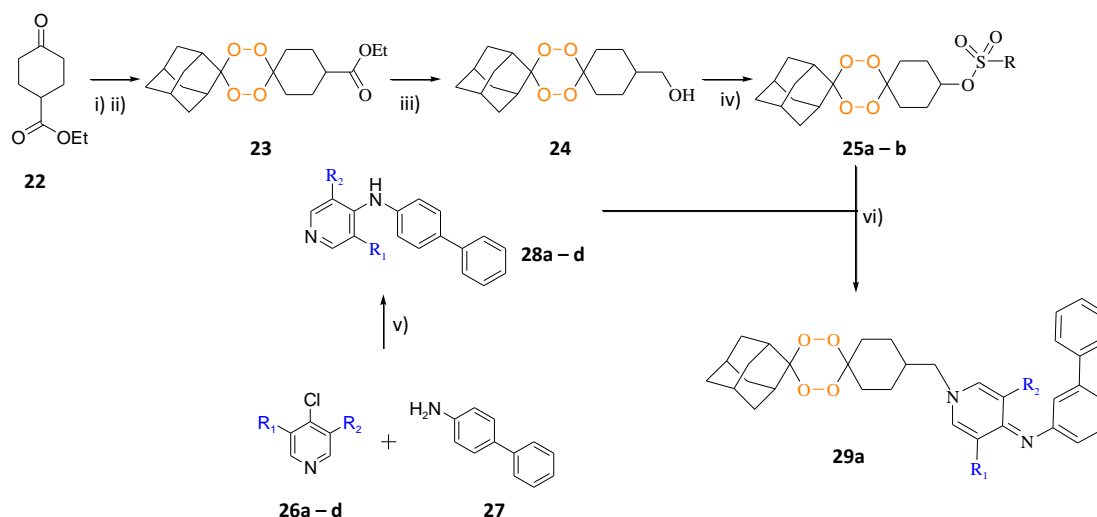


Figura 83 - Retrossíntese do composto híbrido 29 a.

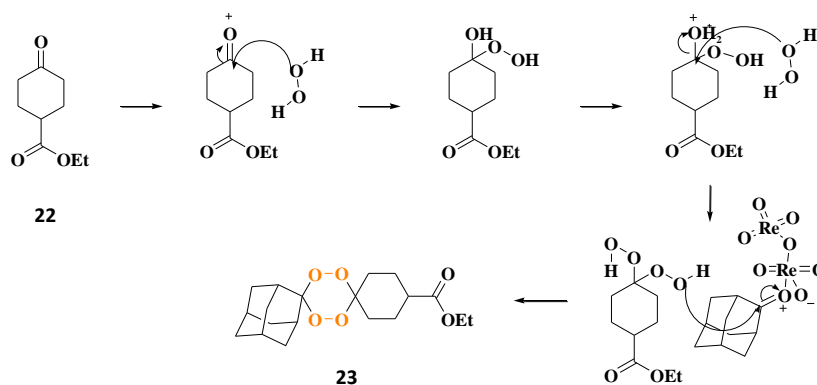
## Esquema Sintético



**Esquema 1: Procedimento Sintético utilizado para obter o composto híbrido 29a. Reagentes e Condições:**  
i)  $\text{HCO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  50%, t.a.; ii)  $\text{Re}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2-Adamantanona, t.a; iii)  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , t.a.; iv) **25a** ( $\text{R}=\text{CH}_3$ ):  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ , THF,  $50^\circ\text{C}$ ; **25b** ( $\text{R}=\text{CF}_3$ ):  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ , DCM,  $-20^\circ\text{C}$ , 2,6-Dimetilpiridina; v) **28a**: ( $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$ ) EtOH,  $\text{Et}_3\text{N}$ , refluxo; **28b**: ( $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{Cl}$ ) Tolueno,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , ( $\pm$ )Binap, refluxo; **28c**: ( $\text{R}_1=\text{H}$ ,  $\text{R}_2=\text{NH}_2$ ); **28d**: ( $\text{R}_1=\text{H}$ ,  $\text{R}_2=\text{NO}_2$ ) MeOH,  $\text{Et}_3\text{N}$ , refluxo; vi) **29a**: DMF, NaH,  $0^\circ\text{C}$  – t.a.

### 2.1.1. Tetraoxano com função éster (23)

Os dihidroperóxidos são derivados estáveis de aldeídos e cetonas e importantes intermediários na síntese de diversas classes de peróxidos, incluindo os tetraoxanos. Na literatura estão descritas diversas metodologias para a síntese de dihidroperóxidos <sup>[27, 28]</sup>. Neste trabalho e, com vista à obtenção do tetraoxano usou-se a metodologia de O'Neill *et al* <sup>[55]</sup>. Primeiramente e recorrendo à catálise ácida oxidou-se um composto carbonílico com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguindo-se a ciclização do dihidroperóxido formado com outro composto carbonílico (**Figura 24**).



**Figura 84** - Mecanismo proposto para a síntese do tetraoxano éster (**23**).

Após purificação por cromatografia em coluna, o composto **23** foi obtido com um rendimento de 49%. Este composto foi caracterizado por <sup>1</sup>H RMN (**Figura 25**), técnica bidimensional de COSY, espectroscopia de infravermelho e ponto de fusão.

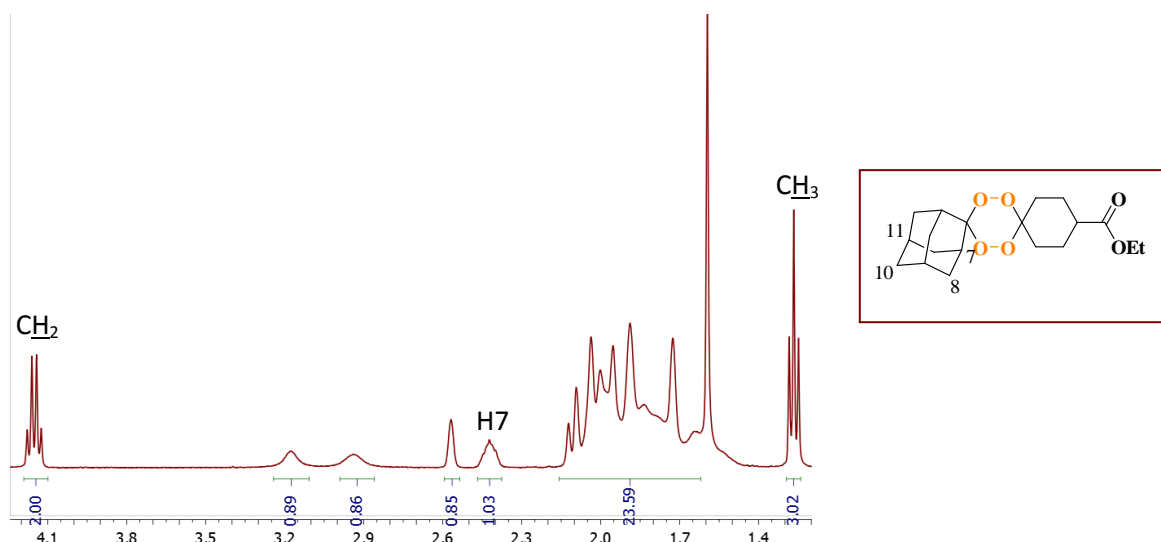


Figura 85 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto **23**.

Os prótons do anel de adamantano e do ciclohexano dão origem a um sinal bastante complexo, conseguindo-se apenas distinguir o próton em C7. Este surge como um multipeto, a 2,40 ppm. Os sinais dos prótons do grupo metilo e do grupo metileno do éster aparecem bem definidos com a sua aparência característica a 1,24 ppm e 4,16 ppm respectivamente.

O espectro de infravermelho pela presença das bandas a  $996,77$  e  $1060,95\text{cm}^{-1}$ , características das ligações peroxídicas dos tetraoxanos e da banda a  $1734,01\text{cm}^{-1}$ , típica de um grupo carbonilo de um éster, permitiu-nos confirmar a estrutura do composto sintetizado.

Para aferir a pureza do composto **23** determinou-se o ponto de fusão. O valor obtido,  $67\text{-}69^\circ\text{C}$ , está de acordo com o referido na literatura.

### 2.1.2. Tetraoxano com função álcool (24)

O composto **24** foi obtido através da redução do composto **23**, de acordo com o descrito por Opsenica *et al* <sup>[56]</sup>. A redução de ésteres a álcoois com o hidreto de alumínio-lítio ocorre através da transferência de dois iões hidreto do agente redutor para o carbono do grupo carbonilo. O oxigénio é depois protonado em meio ácido dando origem ao álcool (**Figura 26**).

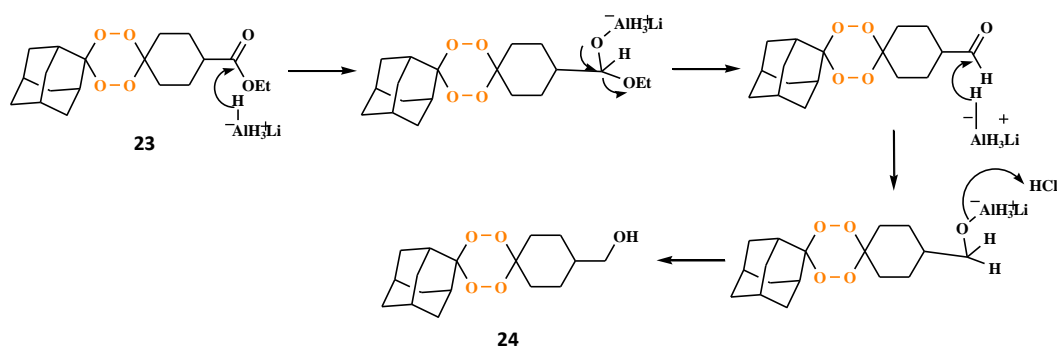


Figura 86 - Mecanismo proposto para a síntese do tetraoxano álcool (**24**).

O composto **24** foi caracterizado por  $^1\text{H}$  RMN (Figura 27), técnica bidimensional de COSY, espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massa.

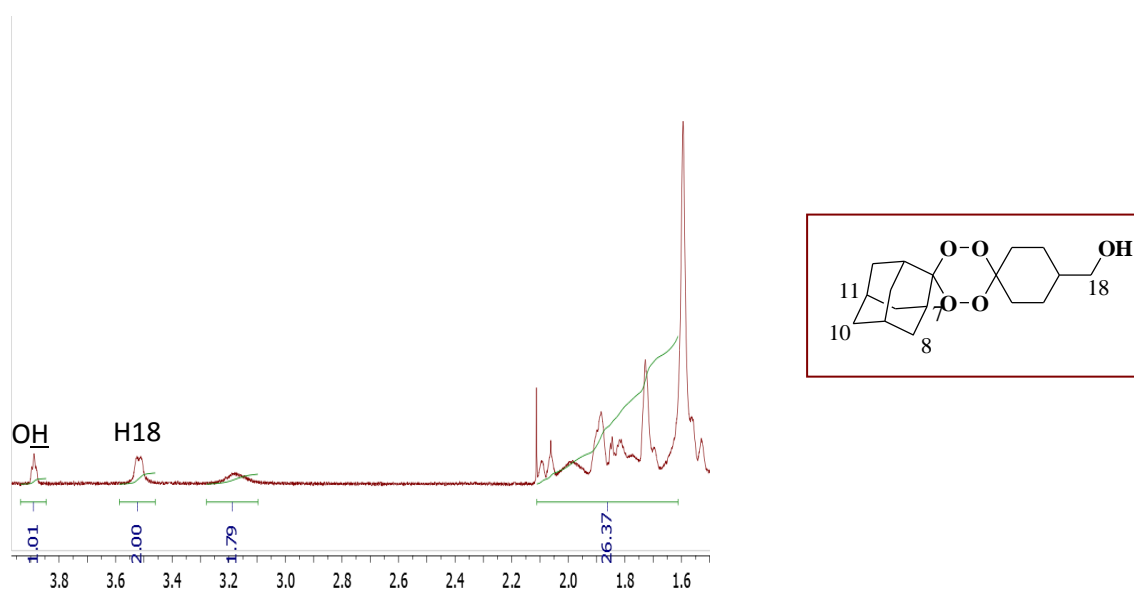


Figura 87- Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto **24**.

No espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto **24** pode-se observar o sinal correspondente aos prótons metilênicos a 3,50 ppm. Já o próton hidroxílico aparece bastante desblindado, a 3,88 ppm.

No espectro de IV do composto **24** foi possível observar não só o desaparecimento da banda correspondente ao grupo carbonilo, comparativamente ao composto **23**, mas também o aparecimento de uma nova banda alargada a aproximadamente  $3250\text{ cm}^{-1}$  característica da presença de um grupo hidroxilo na molécula.

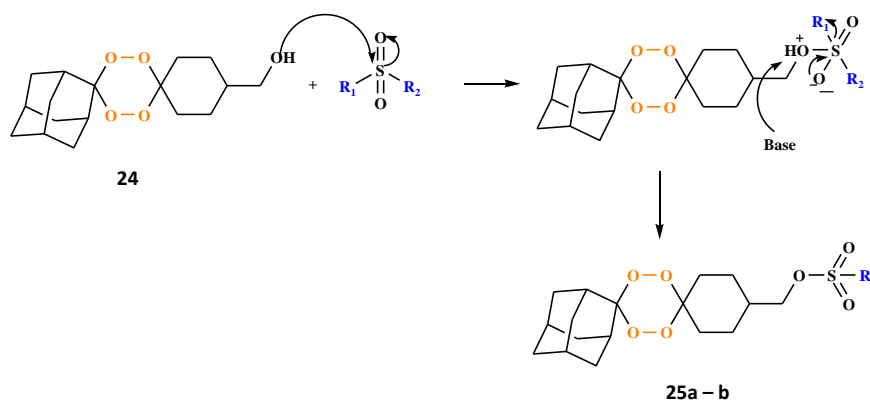
Por espectrometria de massa pode-se observar o pico corresponde aos aductos do ião molecular com a amónia  $[M+NH_4] = 328,16$  e com o potássio  $[M+K] = 349,01$ .

### 2.1.3 Síntese do derivado sulfonado (25)

A síntese do composto híbrido **29a** faz-se por uma reacção de substituição nucleofílica ( $SN_2$ ) e esta reacção é tanto mais fácil de ocorrer quanto menor for o pka do grupo abandonante. Assim, é necessário converter a função álcool do tetraoxano (**24**) num melhor grupo abandonante (**25a – b**).

- **Composto 25a – b**

A síntese do composto **25a** fez-se de acordo com o procedimento de Kumar *et al* <sup>[52]</sup> e a síntese do composto **25b** fez-se conforme os métodos descritos por Lombardo *et al* <sup>[53]</sup> e Shen *et al* <sup>[54]</sup>. A obtenção do tetraoxano com um melhor grupo abandonante ocorre segundo uma reacção de adição – eliminação: inicialmente o oxigénio do álcool reage como nucleófilo com o enxofre e a posterior eliminação do bom grupo abandonante permite sintetizar o produto sulfonado (**Figura 28**).



**Figura 88-** Mecanismo proposto para a síntese do tetraoxano sulfonado.  $R_1=Cl$  e  $R_2=CH_3$  ou  $R_1=OSO_2CF_3$  e  $R_2=CF_3$ .  
**25a:**  $R_2=CH_3$  **25b:**  $R_2=CF_3$

O composto **25a** foi purificado por cromatografia em coluna e obtido com um rendimento de 61% tendo sido posteriormente caracterizado por  $^1H$  RMN (**Figura 29**), técnica bidimensional de COSY, espectroscopia de infravermelho, ponto de fusão e espectrometria de massa. Já o composto **25b** não foi isolado e prosseguiu-se logo para a reacção seguinte porque este não é estável mais do que 12h à temperatura ambiente sob atmosfera de azoto.

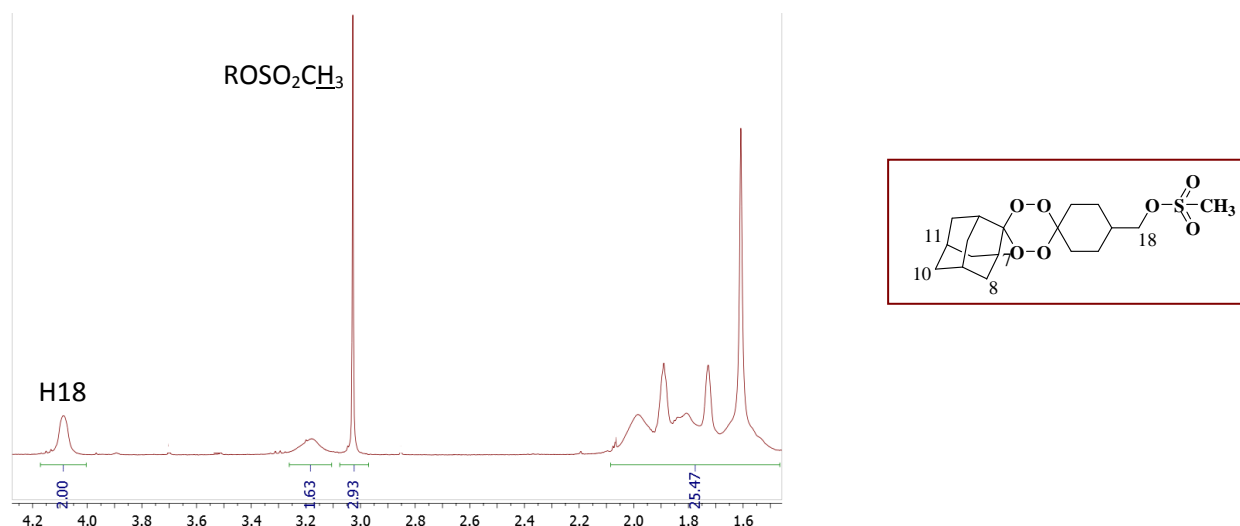


Figura 89- Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto **25a**.

O sinal dos prótons do grupo metileno (4,06 ppm) aparece mais desblindado do que no composto **24** e o sinal dos prótons do grupo metilo (3,00 ppm) surge também muito mais desblindado que o típico para este tipo de prótons <sup>[57]</sup>. Tal deve-se ao efeito electrotractor do grupo metanossulfonato.

No espectro de IV desapareceu a banda larga a  $3250\text{cm}^{-1}$  característica de álcoois e surgiram bandas a  $1174\text{ cm}^{-1}$  (estiramento simétrico das ligações S=O) e  $1350\text{ cm}^{-1}$  (estiramento assimétrico das ligações S=O).

Por espectrometria de massa foi possível observar o pico dos aductos do ião molecular com o sódio [ $\text{M}+\text{Na}= 411,07$ ] e com o potássio [ $\text{M}+\text{K}= 427,06$ ].

A pureza do composto foi testada pela determinação do ponto de fusão e o valor obtido foi  $105\text{-}107^\circ\text{C}$ .

#### 2.1.4. Síntese das Aminopiridinas (28)

Para sintetizar os compostos **28a – d** (Figura 30) utilizaram-se três técnicas diferentes (Tabela 2). Primeiramente tentou-se fazer uma reacção de substituição nucleofílica aromática entre a anilina (composto **27**) e a respectiva 4-cloropiridina (composto **26a – d**) utilizando o refluxo como fonte de energia (Método A). Visto esta técnica não ter permitido obter os compostos **28b e c**, tentou-se a sua síntese recorrendo a micro-ondas (Método B).

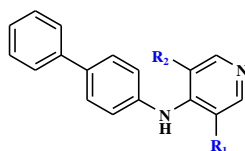
Quando uma mistura reaccional é aquecida através de micro-ondas, factores como a condutividade térmica do balão que contém os reagentes deixam de condicionar a reacção



dado que menos de um minuto é suficiente para gerar o aumento da temperatura até ao valor desejado.

Contudo, o micro-ondas também não permitiu obter os compostos de interesse com um rendimento aceitável. Dado que o aquecimento por refluxo parecia ser uma técnica muito suave e o micro-ondas parecia ser uma técnica muito agressiva, a próxima abordagem foi a utilização de um tubo de pressão. No entanto, mais uma vez não foi possível obter os compostos **28b** e **c**.

Dado que a síntese dos compostos pretendidos não parecia ser possível por reacção de substituição nucleofílica aromática, procuraram-se outras abordagens. Quando o composto **26** reage com o **27** ocorre a formação de uma ligação C-N e uma das estratégias mais recentes para formar este tipo de ligações é a reacção de Buchwald-Hartwig (**Métodos C e D**).



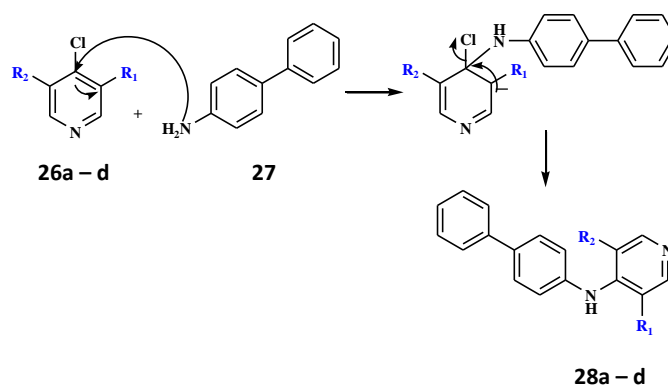
**Figura 90** - Estrutura geral das aminopiridinas **28**.

**Tabela 4** - Tabela resumo dos rendimentos da síntese das aminopiridinas pelos métodos A – D.

Composto	Método	Reacção	Fonte de Energia	R1	R2	η
<b>28a</b>	A	Substituição nucleofílica aromática	Refluxo	H	H	92%
<b>28b</b>	A	Substituição nucleofílica aromática	Refluxo	Cl	Cl	-
	B	Substituição nucleofílica aromática	Micro-ondas			5%
	C	Buchwald-Hartwig	Refluxo			29%
<b>28c</b>	A	Substituição nucleofílica aromática	Refluxo	H	NH <sub>2</sub>	-
	B	Substituição nucleofílica aromática	Micro-ondas			-
	D	Buchwald-Hartwig	Refluxo			-
<b>28d</b>	A	Substituição nucleofílica aromática	Refluxo	H	NO <sub>2</sub>	87%

Os compostos **28a** e **28d** foram então sintetizados por reacção de substituição nucleofílica aromática usando o refluxo. Este tipo de reacções dá-se em dois passos: inicialmente ocorre adição de um nucleófilo forte como o ião hidroxilo ou uma amina ao anel aromático, formando-se um carbaníon que é estabilizado por ressonância, de seguida, há eliminação do bom grupo abandonante (**Figura 31**).

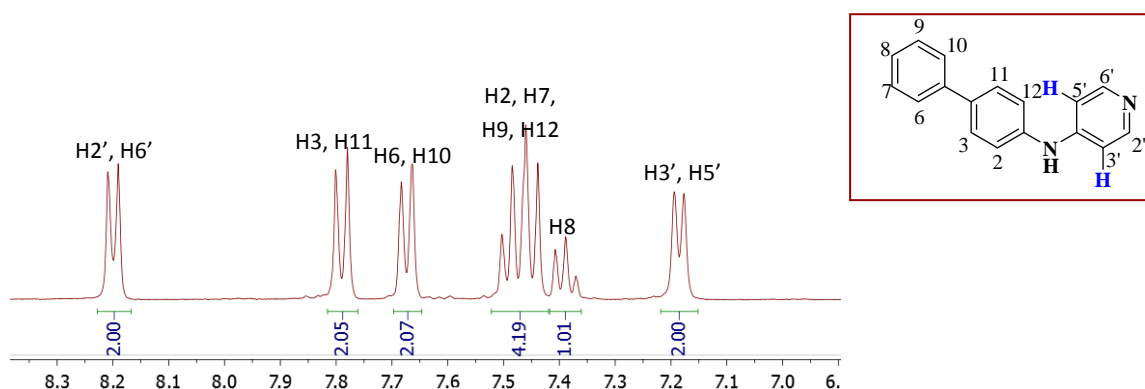
As reacções de substituição nucleofílica aromática são tanto mais fáceis de ocorrer quanto menor for a energia do estado de transição, determinada pela estabilidade do carbaníon formado. Assim sendo, grupos atractores de electrões e átomos electronegativos, como halogénios, no anel, vão favorecer a reacção <sup>[58]</sup>.



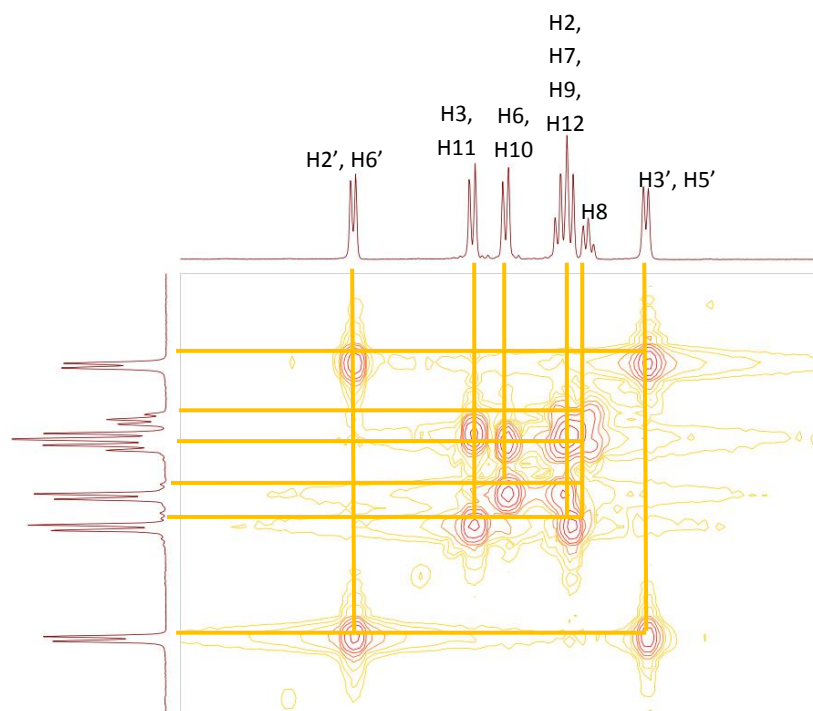
**Figura 91** - Mecanismo proposto para a síntese dos compostos **28a – d**.

a:  $R_1=H$  e  $R_2=H$ ; b:  $R_1=Cl$  e  $R_2=Cl$ ; c:  $R_1=H$  e  $R_2=NH_2$ ; d:  $R_1=H$  e  $R_2=NO_2$ ;

As aminopiridinas **28a** e **28d** foram caracterizados por  $^1H$  RMN e técnica bidimensional de COSY. O composto **28a** foi também caracterizado por espectrometria de massa.



**Figura 92**- Espectro  $^1H$  RMN do composto **28a**.



**Figura 93-** Espectro COSY do composto **28a**.

No espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto **28a** (**Figura 32**) podem-se observar seis tipos de prótons. Os prótons  $\text{H2}'$ ,  $\text{H6}'$  são os mais desblindados dada a sua proximidade ao átomo de azoto da piridina. Pelo espectro COSY (**Figura 33**) conseguimos identificar os prótons  $\text{H3}'$ ,  $\text{H5}'$ , cujo sinal é um duplete a 7,19-7,20 ppm. Os prótons  $\text{H3}$ ,  $\text{H11}$  (7,79-7,81 ppm) são os mais desblindados do sistema bifenilo e o próton  $\text{H8}$  (7,38-7,41ppm) surge na **Figura 32** como um tripleto a 7,38-7,41ppm. Na **Figura 33** é visível o acoplamento do próton  $\text{H8}$  com o sinal a 7,45 -7,51 ppm ( $\text{H7}$ ,  $\text{H9}$  e  $\text{H2}$ ,  $\text{H12}$ ) sendo que, este sinal acopla também com os prótons a 7,67-7,69 ppm ( $\text{H6}$ ,  $\text{H10}$ ). Por espectrometria de massa foi possível observar o pico correspondente ao ião molecular  $[\text{M}+\text{H}] = 247,09$ .

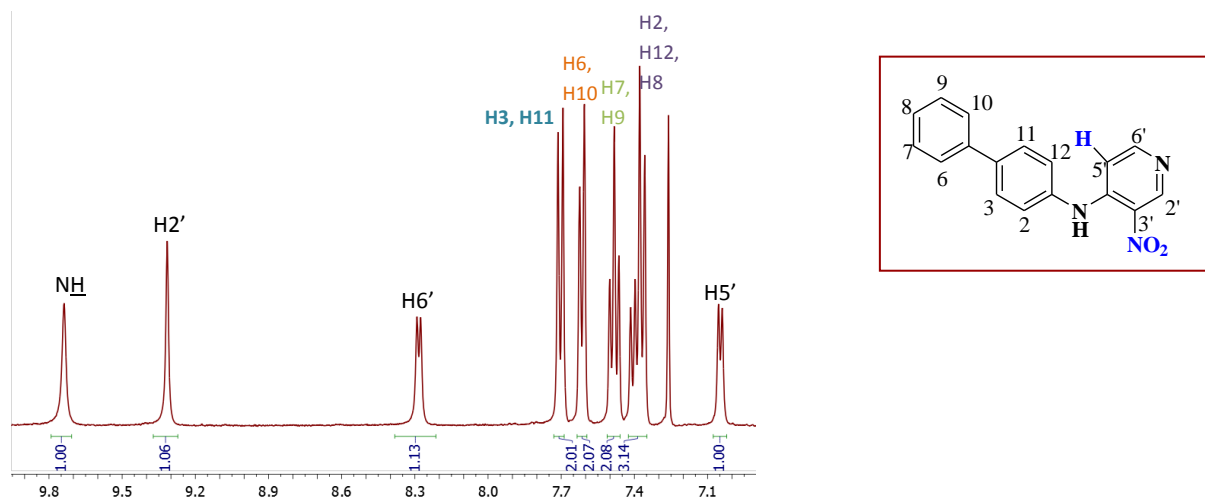


Figura 94- Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto **28d**.

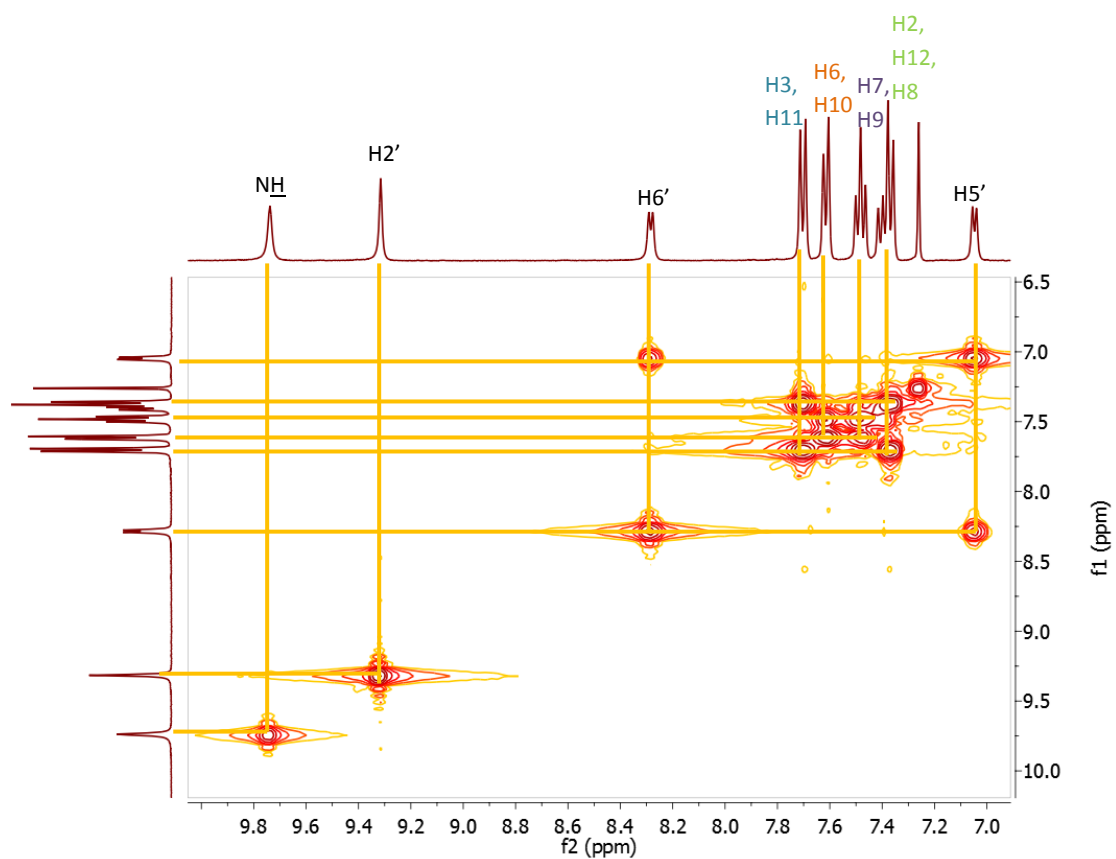
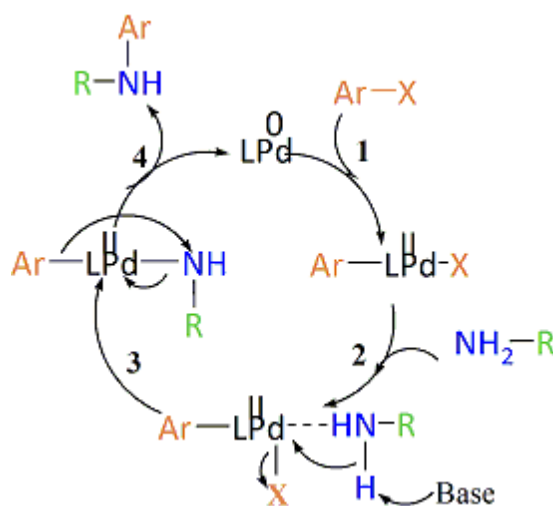


Figura 95- Espectro Cosy do composto **28d**.

A substituição de um hidrogénio do anel piridínico (Composto **28a**) por um grupo nitro (Composto **28d**) provoca alterações significativas no espectro de  $^1\text{H}$  RMN (**Figura 34**). O protão na posição 2' está agora mais desblindado (9,32 ppm) e deixa de ser equivalente ao protão na posição 6' (8,28 ppm). Já o protão H5' surge como um duplete a 7,05 ppm (**Figura 35**). Os protões H3, H11 (7,70 ppm) são os mais desblindados do sistema bifenilo, logo pela **Figura 35**, os protões H6, H10 aparecem como duplete a 7,61 ppm, o tripleto a 7,48 ppm corresponde aos protões H7, H9 e os sinais dos protões H8 e H2, H12 aparecem sobrepostos a 7,40 ppm.

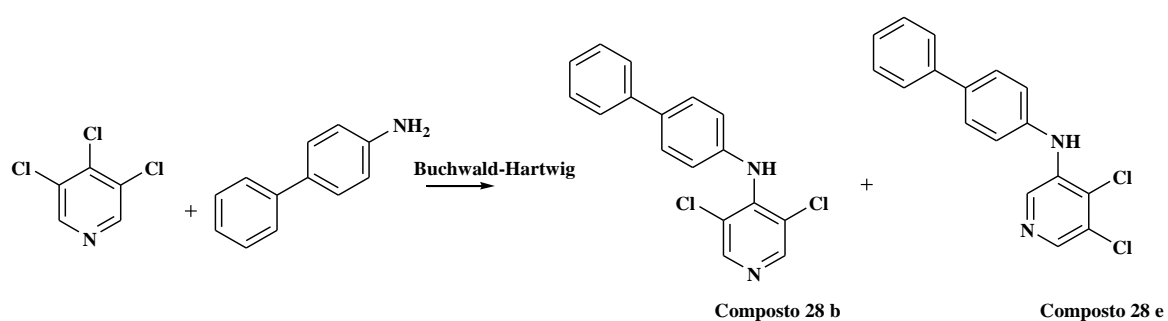
O protão do grupo amina (9,74 ppm) aparece extremamente desblindado devido à estabilização por ressonância do grupo  $\text{NO}_2$  pelo par de electrões do azoto da amina.

A síntese do composto **28b** foi possível através de reacção de substituição nucleofílica usando o micro-ondas como fonte de energia, no entanto esta técnica tinha um rendimento muito baixo. Assim, este composto foi também sintetizado pela reacção de Buchwald-Hartwig. Esta reacção consiste no acoplamento de um haleto de arilo a uma amina, na presença de uma base forte e do paládio que funciona como catalisador. A reacção começa pela adição oxidativa do haleto de arilo ao paládio, segue-se a coordenação da amina ao complexo, a base abstrai um protão à amina formando um intermediário que ataca o paládio e provoca a saída do bom grupo abandonante (halogénio). A eliminação redutiva permite a libertação do produto arilo amina com regeneração do catalisador (**Figura 36**)<sup>[59, 60]</sup>.



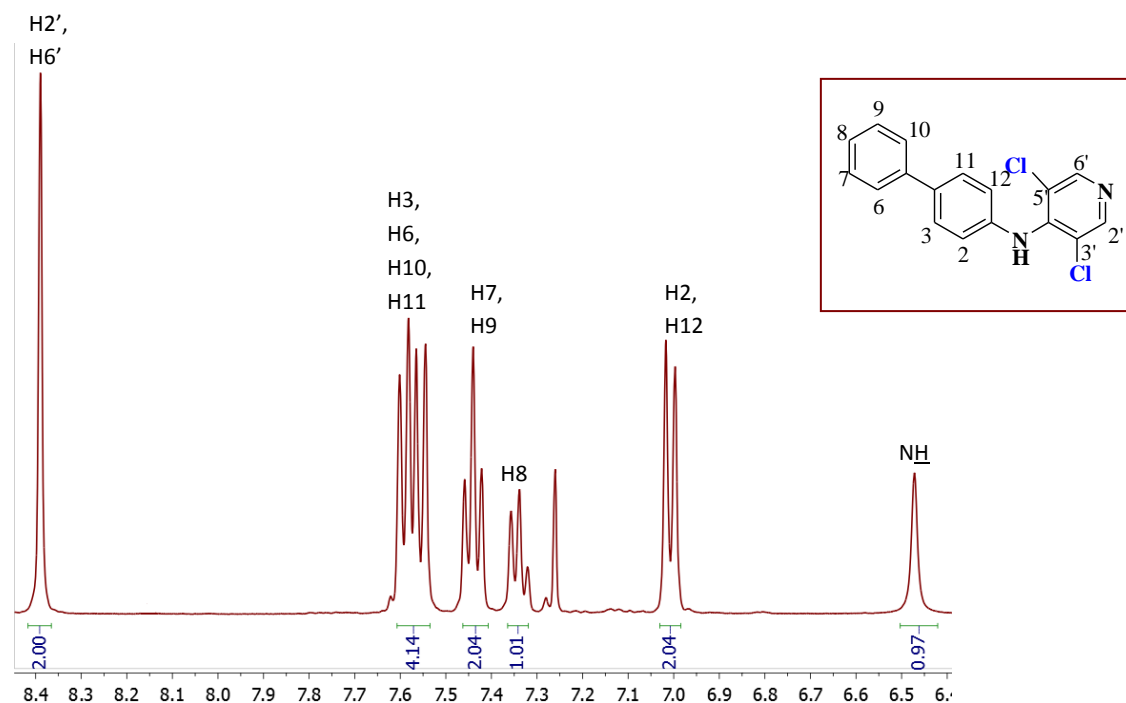
**Figura 96-** Mecanismo proposto para a síntese dos compostos **28b** e **c** pela reacção de Buchwald Hartwig. 1: Adição Oxidativa; 2: Coordenação da amina ao paládio; 3: Formação da ligação Pd-N; 4: Eliminação Redutiva.

O rendimento da síntese do composto **28b** por reacção de Buchwald-Hartwig não foi muito elevado porque além do produto de interesse, também se obtém uma grande quantidade do composto **28e** (**Figura 37**).



**Figura 97** – Produtos obtidos na síntese do composto **28b** por reacção de Buchwald-Hartwig.

O composto **28b** foi caracterizado por  $^1\text{H}$  RMN (**Figura 38**) e técnica bidimensional de COSY (**Figura 39**).



**Figura 98** - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto **28b**.

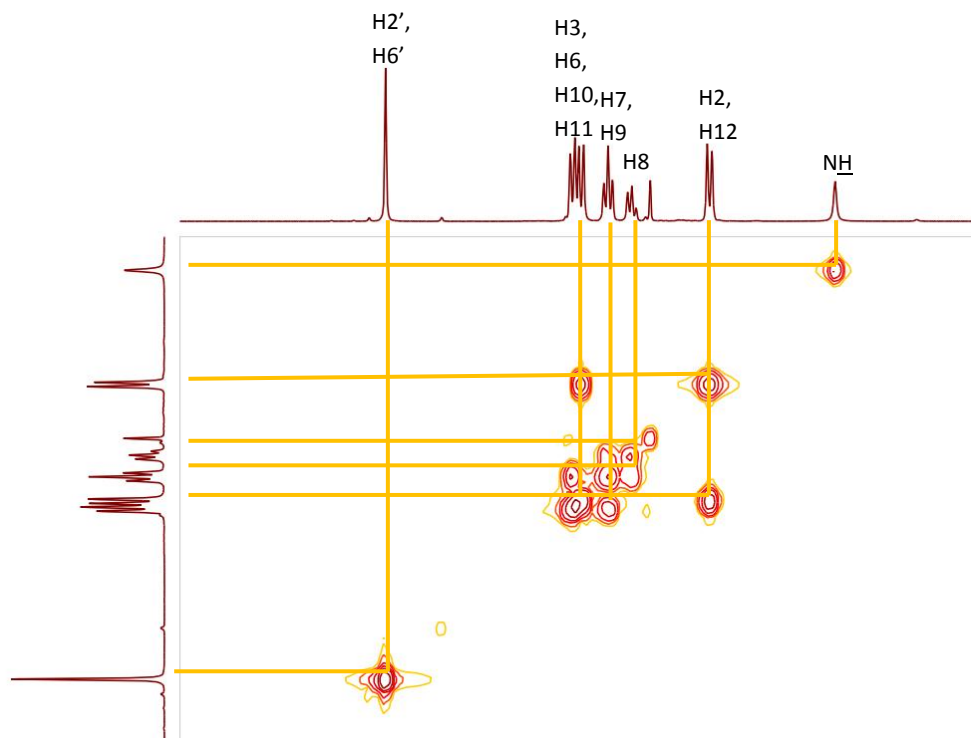


Figura 99 – Espectro COSY do composto **28b**.

Os prótons nas posições 2' e 6' são equivalentes e os mais desblindados pelo que surgem como um singuleto a 8,39 ppm. O próton ligado ao azoto do grupo amina surge como um singuleto largo a 6,47 ppm e o próton da posição 8 surge como um tripleto a 7,32-7,36 ppm. Pela análise da **Figura 39** podem-se fazer as atribuições dos restantes sinais do espectro. O sinal a 7,54-7,60 ppm é o dos prótons nas posições 3, 11, 6 e 10, o tripleto a 7,42-7,44 ppm representa os prótons nas posições 7 e 9 e, por fim, o duplete a 7,00-7,02 ppm é o sinal dos prótons nas posições 2 e 12.

Nenhuma das técnicas utilizadas permitiu obter o composto **28c**. Procedimentos alternativos para a sua síntese podem passar pela redução do composto **28d** ou em alternativa pode-se proteger o grupo amina da piridina e depois fazer uma reacção de Buchwald-Hartwig.

### 2.1.5. Síntese dos Compostos Híbridos Tetraoxano-Piridonimina (29)

Na tentativa de explorar as melhores condições de síntese, por substituição nucleofílica, para os compostos híbridos **29** estudou-se a reactividade dos compostos **25** apenas com o composto **28a**.

A velocidade das reacções de substituição nucleofílica varia com a temperatura, a força do nucleofílico e o tipo de grupo abandonante.<sup>[58]</sup> Para tentar obter os compostos **29** usaram-se dois grupos abandonantes: o triflato mais reactivo e o mesilato que é menos reactivo, variou-se a temperatura da mistura reaccional, desde os 0°C até aos 110°C e ainda se testou a força do nucleófilo, através da activação da aminopiridina com uma base para aumentar a nucleofilicidade do azoto piridínico (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Variação das condições reaccionais para tentar sintetizar os compostos **29**. \*: A aminopiridinina foi activada antes de ser adicionada à mistura reaccional.

Grupo abandonante	Condições		Rendimento
	Temperatura	Base	
Mesilato	T.a.-110°C	-	-
	40°C	1eq	-
	40°C	1,2eq*	5%
	0°C – T.a.	1,2eq*	11%
Triflato	-20°C – T.a.	1 eq*	-

O calor favorece as reacções de eliminação em detrimento da substituição pelo que para obter o composto **29** não se deve utilizar uma temperatura muito mais elevada que a temperatura ambiente. O grupo abandonante mesilato, apesar de menos reactivo, foi aquele que permitiu obter melhores resultados. O azoto da piridina é um nucleófilo fraco pelo que para tentar torná-lo mais nucleofílico recorreu-se uma base forte (**Figura 40**).



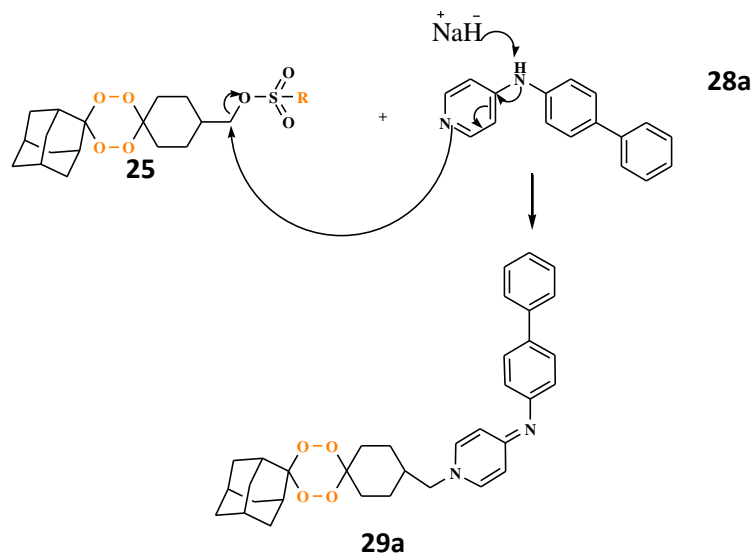
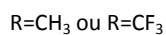


Figura 100 - Mecanismo proposto para a síntese dos compostos 29.



O melhor rendimento obtido para o composto **29a** foi 11% e fez-se caracterização por <sup>1</sup>H (Figura 41) e <sup>13</sup>C RMN, técnica de COSY (Figura 42), HMQC e espectrometria de massa.

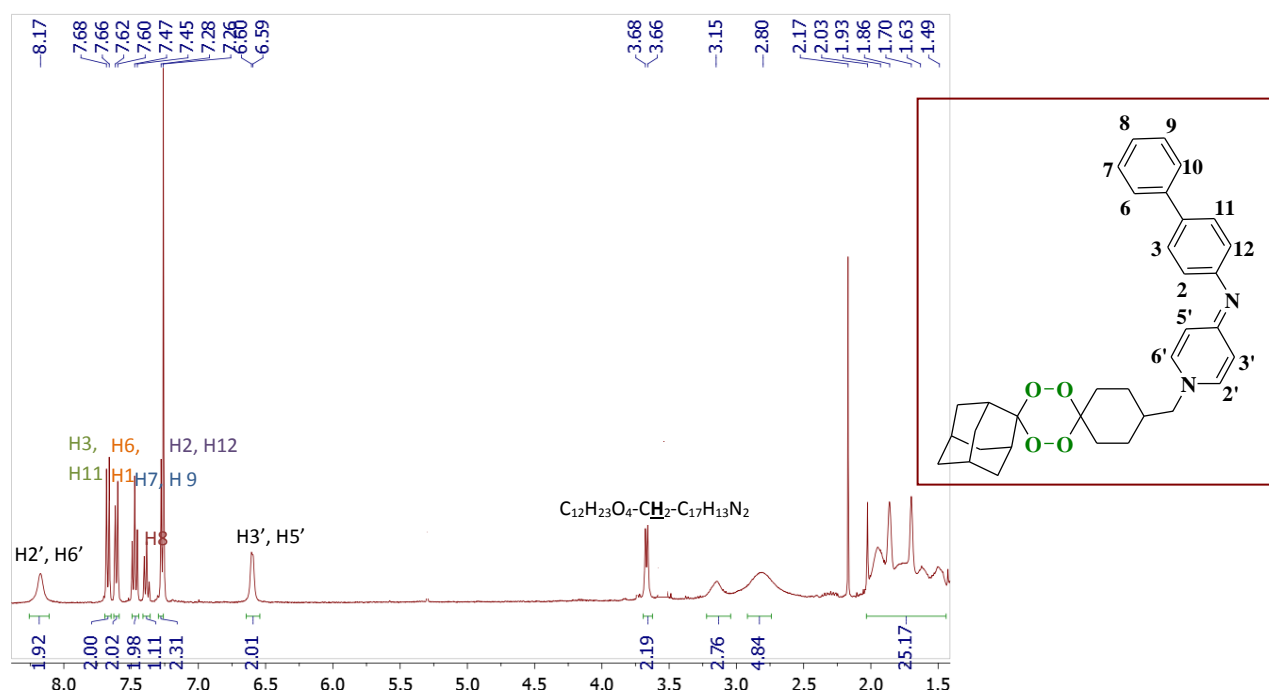


Figura 101 - Espectro <sup>1</sup>H RMN do composto 29a.

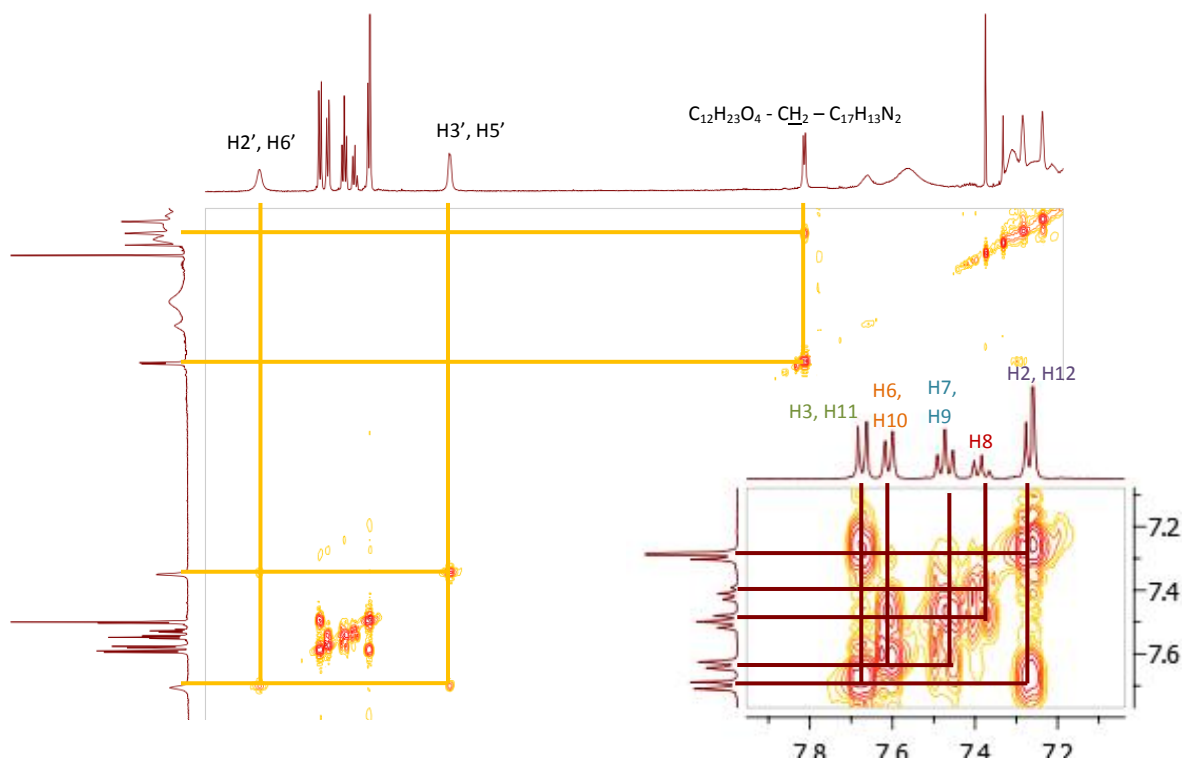


Figura 102 - Espectro COSY do composto **29a**.

Os prótons metilênicos que estabelecem a ligação entre o tetraoxano e a aminopiridina surgem como um duplete, na **Figura 41**, a 3,66-3,68 ppm.

Os prótons das posições 2' e 6' são os mais desblindados e surgem como um singuleto a 8,17 ppm, já o próton da posição 8 surge como um triplete a 7,37-7,40 ppm. Por análise da **Figura 42** pode-se atribuir o singuleto a 6,59-6,60 ppm aos prótons das posições 3' e 5', o triplete a 7,45-7,49 ppm é o sinal dos prótons nas posições 7 e 9, os prótons H3, H11 aparecem como um duplete a 7,66-7,68 ppm, e os dois dupletos a 7,60-7,62 ppm e 7,26-7,28 ppm correspondem aos prótons nas posições 6, 10 e 2, 12 respectivamente.

Na **Tabela 4** estão sumariados os desvios químicos dos carbonos do composto **29a**.

**Tabela 4** - Desvios químicos dos carbonos do composto **29a**.

Híbrido	Posição do protão	Tipo de carbono	$\delta$ ppm carbono
<b>Tetraoxano</b>	Tetraoxano	-	8,31-37,05
<b>Piridonimina</b>	2', 6'	CH	147,73
	3', 5'	CH	108,70
	3, 11	CH	129,12
	2, 12	CH	127,83
	6,10	CH	127,17
	7, 9	CH	129,12
	8	CH	127,70
<b>Linker</b>	<u>CH</u> <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>	57,64

No espectro de massa observou-se o pico correspondente ao ião molecular [M+H = 539,24].

O composto **29a** foi sintetizado com um rendimento muito baixo pelo que é ainda necessário otimizar a reacção de substituição nucleofílica que permite obter os compostos **29**. Um novo procedimento experimental pode passar pela utilização de outro grupo abandonante, como por exemplo o tosilato que é menos reactivo que o triflato mas mais reactivo que o mesilato.

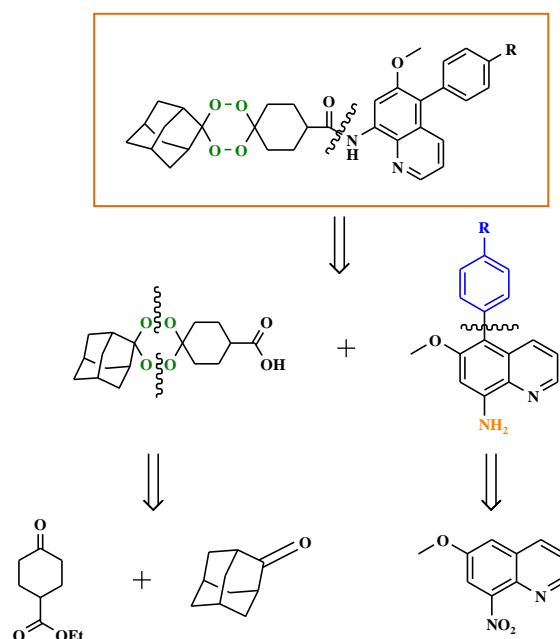
## 2.2. Síntese dos compostos híbridos 1,2,4,5-tetraoxano – 8-aminoquinolina com um *linker* amida

Com o objectivo de sintetizar novas moléculas híbridas baseadas nos farmacóforos 1,2,4,5-tetraoxano e 8-AQ, com actividade na fase sanguínea e na fase hepática do ciclo de vida dos parasitas sintetizaram-se os compostos híbridos **35a – d**.

O farmacóforo 8-AQ foi modificado para que se pudesse estudar não só o efeito da remoção da cadeia lateral da primaquina na actividade do composto mas também as consequências do bloqueio da posição 5 do anel quinolínico no tempo de semi-vida da molécula.

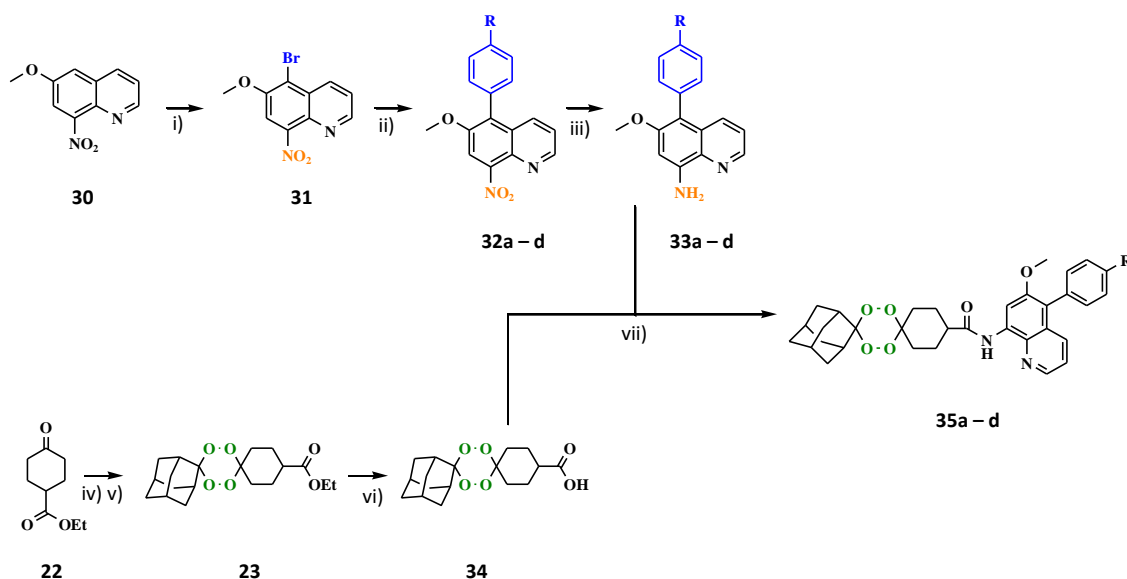
A retrosíntese dos híbridos **35** é apresentada abaixo (**Figura 43**) e evidencia a necessidade de sintetizar um tetraoxano com um grupo carboxilo (**34**) capaz de reagir por adição-eliminação com a aminoquinolina (**33**). O esquema reaccional e os intermediários envolvidos no processo sintético são apresentados no **Esquema 2**.

### Esquema Retrossintético



**Figura 103-** Retrossíntese dos compostos híbridos tetraoxano - aminoquinolina com *linker* amida (**35**).

## Esquema Sintético



**Esquema 2: Procedimento sintético utilizado para obter os compostos híbridos 35. Reagentes e Condições:** i)  $\text{Br}_2$ , Fe,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CHCl}_3$ , refluxo; ii)  $\text{PPh}_3$ ,  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_4\text{NBr}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 M),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , ácido borónico, dimetoxietano, refluxo 39 h; iii)  $\text{SnCl}_2$ , Sn, HCl 37%, 0 °C; iv)  $\text{HCO}_2\text{H}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  50%, t.a.; v)  $\text{Re}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2-Adamantanona; vi) NaOH, MeOH: $\text{H}_2\text{O}$  (3:1), 80 °C; vii) DCM,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}_2$ , t.a. → 60 °C.

### 2.2.1. Síntese do derivado Bromado (31)

A halogenação de compostos aromáticos desactivados como por exemplo piridinas, quinolinas ou isoquinolinas, envolve condições reaccionais severas. As estratégias mais comuns para introduzir um halogéneo num núcleo aromático são a halogenação aromática electrofílica e a reacção de Sandmeyer/Balz-Schiemann<sup>[61]</sup>. Para bromar a 6-metoxi-8-nitroquinolina, na posição 5, usou-se o procedimento descrito por Werble *et al*<sup>[62]</sup>, no qual o catalisador  $\text{FeBr}_3$  permitiu a introdução do bromo na posição 5 do anel quinolínico (**Figura 44**). O composto 31 foi obtido com um rendimento de 70% e a sua caracterização foi efectuada por espectroscopia de IV,  $^1\text{H}$  RMN, ponto de fusão e técnica bidimensional de COSY.

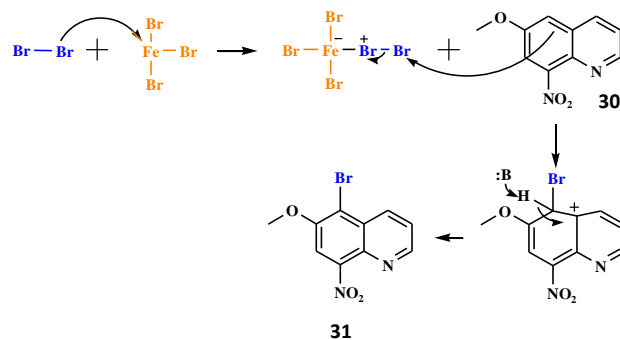


Figura 104 - Mecanismo proposto para a síntese do composto **31**.

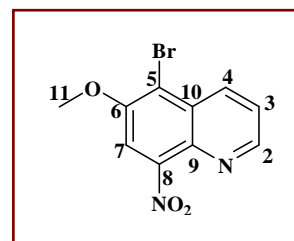
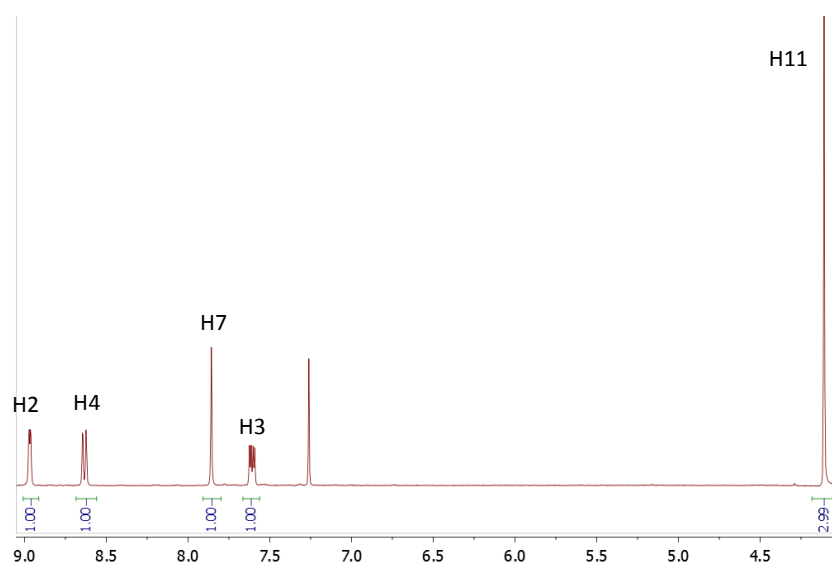


Figura 105 - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto **31**.

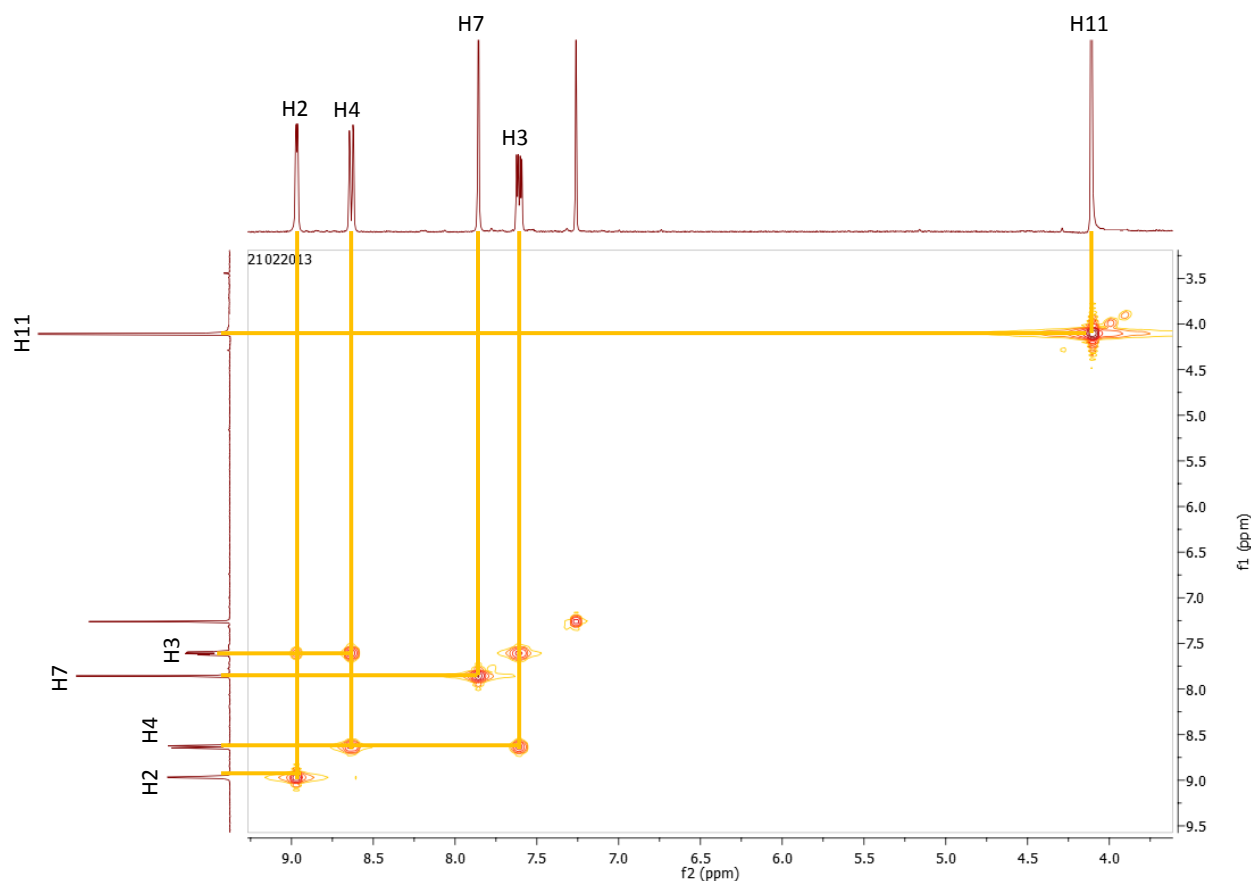


Figura 106 - Espectro COSY do composto **31**.

No espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto **31** (Figura 45) podemos observar 5 tipos de prótons. O próton na posição C2 é aquele que aparece mais desblindado (8,97 ppm). O sinal correspondente a este próton é um duplete com uma constante de acoplamento  $J = 4$  Hz devido ao próton na posição C3 com quem estabelece um acoplamento em *orto*. Este valor de  $J$  é inferior ao descrito na literatura ( $J_{\text{orto}} = 6\text{--}10$  Hz), sendo que tal pode dever-se à proximidade do próton em C2 ao átomo de azoto, electronegativo e por isso susceptível de alterar o seu comportamento magnético. Tal como o próton na posição C2, também o próton na posição C4 (8,62-8,65 ppm) acopla em *orto* com o próton na posição C3 ( $J = 8,7$  Hz) apresentando-se igualmente como um duplete. O próton em C3 (7,59 – 7,62 ppm) apresenta-se como um duplete de dupletos dado que conforme referido anteriormente este acopla não só com os prótons em C4 ( $J = 8,7$  Hz) mas também com os da posição C2 ( $J = 4$  Hz). O próton na posição C7 aparece como um singuleto (7,86 ppm) dado que as posições 6 e 8 não têm hidrogénios. Por fim, os três prótons do grupo metoxilo, na posição C11, são aqueles que aparecem mais blindados (4,11 ppm). As atribuições feitas foram confirmadas através do espectro bidimensional de COSY (Figura 46).

O espectro de infravermelho do composto **31** está de acordo com as descrições que existem na literatura para as quinolinas.<sup>[57]</sup> Existe uma banda de elevada intensidade a  $953\text{cm}^{-1}$  que corresponde à flexão da ligação C-C-C do anel, também na região entre os  $1000$  e os  $1300\text{cm}^{-1}$  se podem observar várias bandas características deste tipo de compostos que reflectem a vibração das ligações C-H no plano e, por fim, na região entre os  $1281$  e os  $1507\text{cm}^{-1}$  observam-se bandas de elevada intensidade que correspondem às vibrações da ligação C-N e C=N.

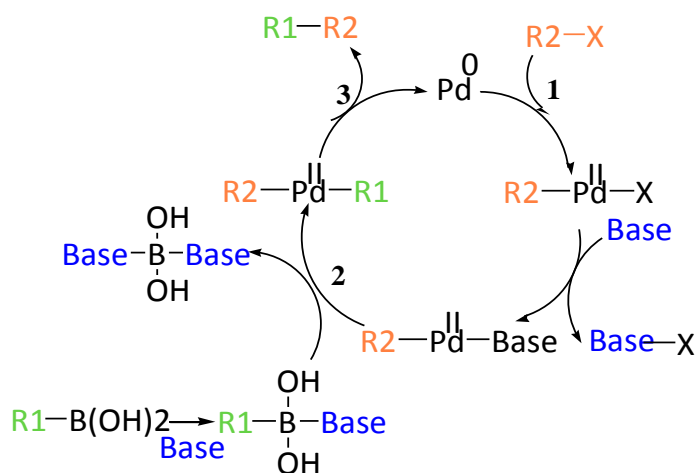
A pureza do composto foi avaliada através da medição do ponto de fusão. O valor obtido,  $205\text{--}208^\circ\text{C}$ , está de acordo com o descrito na literatura <sup>[62]</sup>.

### 2.2.2. Síntese dos Derivados Arilo (**32a – d**)

Na literatura estão descritas várias metodologias para estabelecer ligações carbono-carbono, sendo que, a mais recente usa complexos de paládio e fosfinas como catalisadores de reacções de acoplamento. O mecanismo para estabelecer uma ligação carbono-carbono entre um haleto de arilo e um outro grupo arilo (reacção de Suzuki) envolve um ciclo catalítico que engloba um processo de adição oxidativa do haleto de hidrogénio ao paládio(0), transmetalção do grupo arilo e eliminação redutiva com obtenção do produto biarilo e regeneração das espécies activas de paládio(0) (**Figura 47**) <sup>[63, 64]</sup>.

Para obter os compostos **32a – d** procedeu-se ao acoplamento do composto **31** com diversos ácidos borónicos via reacção de Suzuki e de acordo com os métodos descritos por Miyaura *et al.* <sup>[65]</sup> e Shiraki *et al.* <sup>[66]</sup>.

Após purificação por cromatografia em coluna os compostos **32a – d** (**Figura 48**) foram obtidos com os rendimentos descritos na **Tabela 5**. Todos os compostos foram caracterizados por  $^1\text{H}$  NMR, técnica bidimensional de COSY, espectroscopia de infravermelho e ponto de fusão.

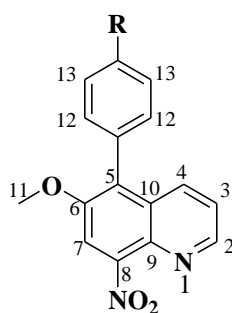


**Figura 107 - Ciclo Catalítico da reacção de Suzuki.** Mecanismo proposto para a síntese dos compostos **32a – d**.  
X = Br. 1 – Adição Oxidativa; 2 – Transmetalção; 3 – Eliminação Redutiva



O rendimento das reacções de Suzuki pode ser influenciado por diversos factores como por exemplo, a reactividade dos haletos de arilo, a solubilidade da base na mistura reaccional ou até mesmo a actividade do complexo metálico.

Na tentativa de obter o melhor rendimento possível variou-se a fonte de paládio usada e o tipo de ligandos visto que a reactividade do complexo metálico é influenciada pelos efeitos estéreos e electrónicos dos ligandos coordenados ao metal. Também a base tem um papel preponderante no sucesso da reacção, assim sendo, usaram-se duas bases diferentes, em pó e em solução para explorar quais as melhores condições para sintetizar os compostos **32a – d** (Tabela 5).



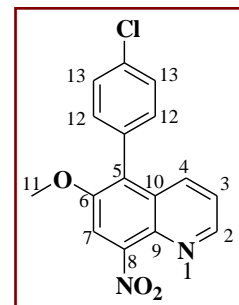
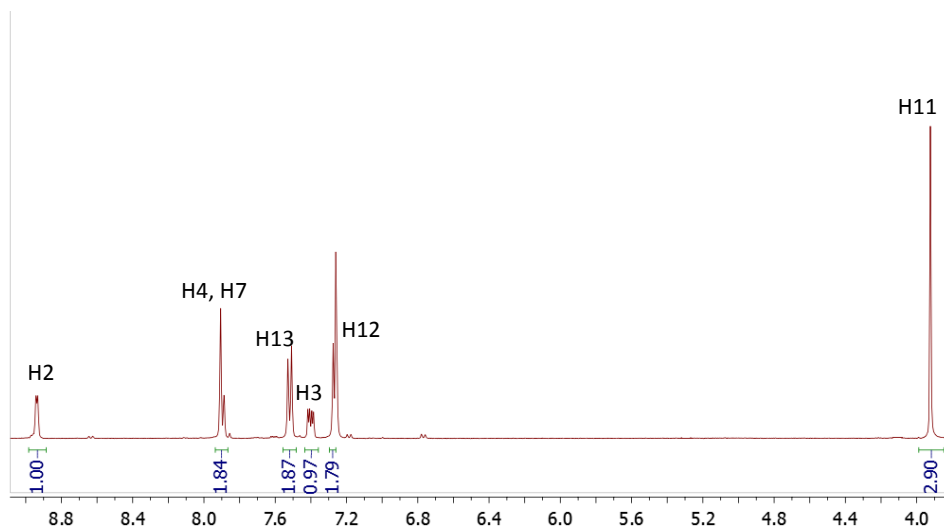
**Figura 108** – Estrutura geral dos compostos **32**. R= F, Cl, Br ou H.

**Tabela 5** - Rendimentos das reacções de Suzuki efectuadas de acordo com os métodos A, B e C.

Composto	R	Método	Catalisador	Base	Ligandos	Rendimento
<b>32a</b>	F	A	$\text{PdCl}_2\text{P}(\text{Ph}_3)_3$ ,	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (sólido)	-	66%
		B	$\text{PdCl}_2\text{P}(\text{Ph}_3)_3$ ,	0,2 M $\text{Cs}_2\text{CO}_3$	-	22%
		C	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	3M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{PPh}_3$ , $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+\text{Br}^-$	53%
<b>32b</b>	Cl	A	$\text{PdCl}_2\text{P}(\text{Ph}_3)_3$ ,	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (sólido)	-	37%
		B	$\text{PdCl}_2\text{P}(\text{Ph}_3)_3$ ,	0,2 M $\text{Cs}_2\text{CO}_3$	-	25%
		C	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	3M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{PPh}_3$ , $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+\text{Br}^-$	63%
<b>32c</b>	Br	A	$\text{PdCl}_2\text{P}(\text{Ph}_3)_3$ ,	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (sólido)	-	30%
		B	$\text{PdCl}_2\text{P}(\text{Ph}_3)_3$ ,	0,2 M $\text{Cs}_2\text{CO}_3$	-	22%
		C	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	3M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{PPh}_3$ , $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+\text{Br}^-$	86%
<b>32d</b>	H	A	$\text{PdCl}_2\text{P}(\text{Ph}_3)_3$ ,	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (sólido)	-	46%
		B	$\text{PdCl}_2\text{P}(\text{Ph}_3)_3$ ,	0,2 M $\text{Cs}_2\text{CO}_3$	-	49%
		C	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	3M $\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{PPh}_3$ , $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+\text{Br}^-$	86%

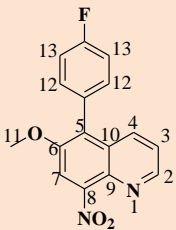
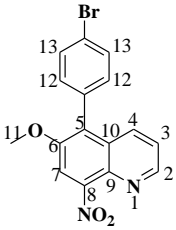
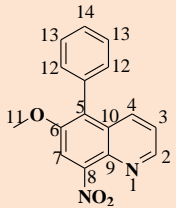
Como podemos observar pela **Tabela 5**, para sintetizar este tipo de compostos a base deve ser uma solução aquosa e o complexo de paládio deve estar complexado com ligandos que actuam como catalisadores de transferência de fase como é o caso do brometo de tetrabutylamónio (Método C).

Os compostos **32a – d** apresentaram espectros de  $^1\text{H}$  RMN bastante semelhantes pelo que abaixo se apresenta como exemplo o espectro do composto **32b** (**Figura 49**). Os espectros das restantes moléculas estão sumariados na **Tabela 6**.



**Figura 109** - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto **32b**.

Tabela 6 – Desvios químicos dos prótons dos compostos 32a, c e d.

Composto	Estrutura	H	$\delta$ ppm	Tipo de Sinal	J Hz
32a		2	8,93	Duplo duplete	4; 1,5
		3	7,40	Duplo duplete	8,7; 4,1
		4	7,90	Multipleto	-
		7		Singuleto	
		11	3,92	Singuleto	-
		12	7,30	Duplo duplete	8,3; 5,9
		13	7,22	Duplete	8,7
32c		2	8,96	Duplo duplete	5,3; 1,3
		3	7,42	Duplo duplete	8,7; 4,2
		4	7,92	Multipleto	-
		7		Singuleto	
		11	3,94	Singuleto	-
		12	7,23	Duplete	8,3
		13	7,70	Duplete	8,3
32d		2	8,93	Duplo duplete	4; 1,5
		3	7,38	Duplo duplete	8,7; 4,1
		4	7,91	Multipleto	-
		7		Singuleto	
		11	3,92	Singuleto	-
		12; 14	7,52	Multipleto	-
		13	7,52	Duplo duplete	6,5; 1,6

A introdução do substituinte arilo-X (X= F, Cl, Br ou H) na posição 5 do anel quinolínico influenciou o comportamento magnético dos prótons nas posições C3, C4, C7 e C11. Enquanto os prótons nas posições C3, C4 e C11 ficaram mais blindados os prótons em C7 ficaram mais desblindados. Tal deve-se ao efeito electroatractor do anel benzénico introduzido que leva não só a uma maior deslocalização electrónica no anel benzénico da quinolina mas também a uma menor deslocalização electrónica no anel piridínico da quinolina. <sup>[57]</sup>

Apesar do próton em C2 nos compostos 32 ter praticamente o mesmo deslocamento químico no espectro que no composto 31, este sinal apresenta-se agora como um duplo duplete

resultado do acoplamento em *orto* com o próton C3 ( $J = 4 - 5,48\text{Hz}$ ) e do acoplamento à distância e em *meta* com o próton C4 ( $J = 1,3 - 1,4\text{Hz}$ ).

Os sinais dos prótons dos grupos arilo introduzidos (C12 e C13) surgem entre os 7,22 e os 7,70 ppm, o que está de acordo com o referido na literatura <sup>[57]</sup>. A multiplicidade do sinal dos prótons em C12 varia com o substituinte: enquanto no espectro dos compostos **32a**, **b** e **c**, estes prótons surgem como dupletos, no espectro do composto **32d** o seu sinal é um multiplete dado que o sinal do próton em C14 aparece sobreposto.

Nos espectros de IV, além das bandas semelhantes ao composto **31**, podemos observar a presença das bandas características de um halogénio ligado a um grupo arilo. O composto **32a** exibe uma banda bastante intensa a  $1256\text{cm}^{-1}$  característica de fluoretos de arilo, o composto **32b** tem uma banda intensa a  $1130\text{cm}^{-1}$  típica de cloretos de arilo e o composto **32c** apresenta uma banda igualmente intensa a  $1074\text{cm}^{-1}$ , comum aos brometos de arilo.

A pureza dos compostos foi avaliada pela determinação do ponto de fusão, tendo-se obtido os valores de  $248\text{ }^{\circ}\text{C} - 250\text{ }^{\circ}\text{C}$  para o composto **32a**,  $265\text{ }^{\circ}\text{C} - 267\text{ }^{\circ}\text{C}$  para o composto **32b**,  $242\text{ }^{\circ}\text{C} - 246\text{ }^{\circ}\text{C}$  para o composto **32c** e  $184\text{ }^{\circ}\text{C} - 186\text{ }^{\circ}\text{C}$  para o composto **32d**.

### 2.2.3. Síntese dos Derivados Amina (33a – d)

Para obter os compostos **33a – d** a partir dos compostos **30** reduziu-se o grupo nitro a amina. Na literatura estão descritas diversas metodologias para esta reacção, nomeadamente o uso de metais como o zinco, o estanho ou o ferro em soluções ácidas ou a hidrogenação catalítica <sup>[67]</sup>. Na síntese dos compostos **33a – d** procedeu-se segundo o método descrito por *Portela et al* <sup>[68]</sup>. Esta técnica baseia-se na transferência de electrões do ião estanhoso para o grupo nitro, com formação de um ião radical que depois é protonado em meio ácido. Por fim, a eliminação de água permite obter o derivado amina (**Figura 50**).

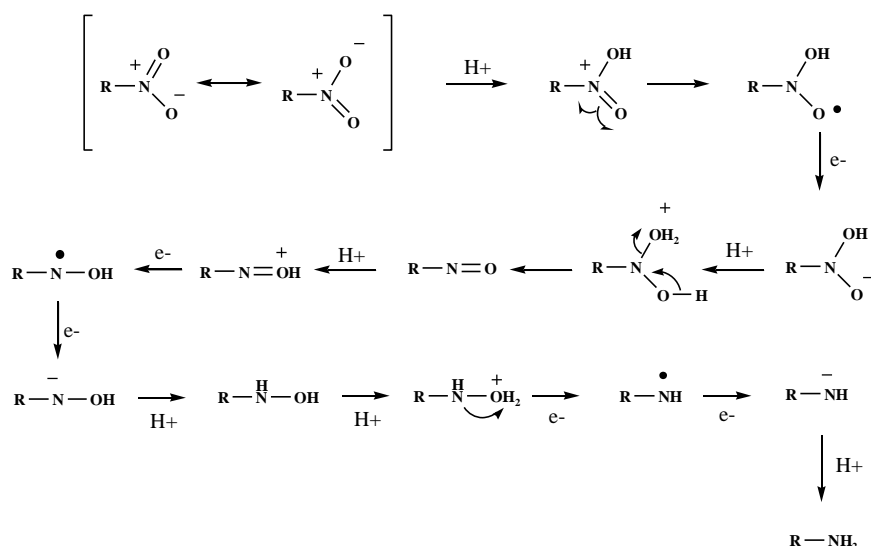


Figura 110 - Mecanismo proposto para a síntese dos compostos **33a – d**.

Após purificação por cromatografia em coluna o composto **33a** ( $\text{R} = \text{F}$ ) foi obtido com um rendimento de 62%, o composto **33b** ( $\text{R} = \text{Cl}$ ) com um rendimento de 54%, o composto **33c** ( $\text{R} = \text{Br}$ ) com um rendimento de 79% e o composto **33d** ( $\text{R} = \text{H}$ ) com um rendimento de 63%. Todos eles foram caracterizados por  $^1\text{H}$  RMN, técnica bidimensional de COSY e espectroscopia de infravermelho.

Visto que os espectros  $^1\text{H}$  RMN dos compostos **33a – d** são semelhantes, abaixo apresenta-se, como exemplo, o espectro do composto **33b** (Figura 51). Os espectros de próton dos restantes compostos **33** estão compilados na Tabela 7.

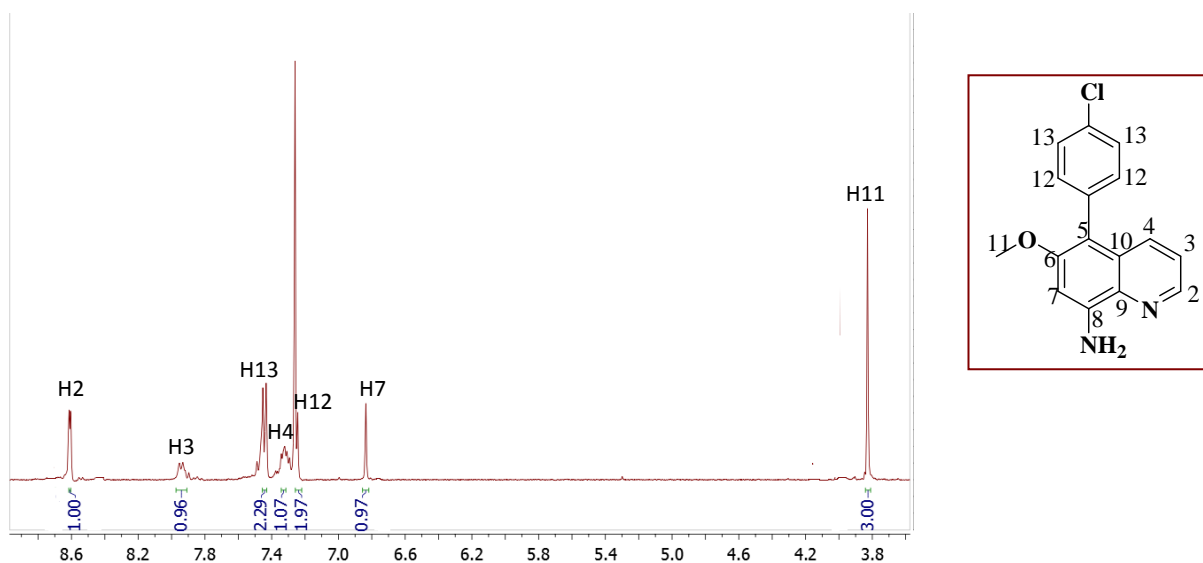
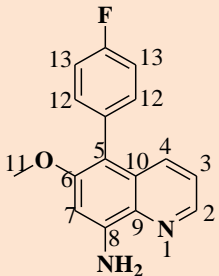
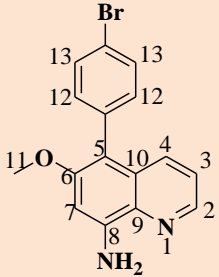
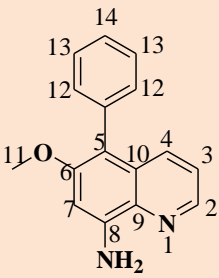


Figura 111 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto **33b**.

**Tabela 7** - Desvios químicos dos prótons dos compostos **33a**, **c** e **d**.

Composto	Estrutura	H	$\delta$ ppm	Tipo de Sinal	J Hz
<b>33a</b>		2	8,61	Duplo dupleto	5,6; 1,4
		3	7,31	Multiplero	-
		4	7,91	Singuleto	-
		7	6,83	Singuleto	-
		11	3,83	Singuleto	-
		12	7,16	Tripleto	8,7
		13	7,31	Multiplero	-
		NH <sub>2</sub>	-	-	-
<b>33c</b>		2	8,59	Duplo dupleto	5,1; 1,2
		3	7,24	Dupleto	4,1
		4	7,78	Duplo dupleto	8,6; 1,4
		7	6,78	Singuleto	-
		11	3,81	Singuleto	-
		12	7,21	Dupleto	8,1
		13	7,58	Dupleto	8,3
		NH <sub>2</sub>	5,14	Singuleto largo	-
<b>33d</b>		2	8,60	Duplo dupleto	4,1; 1,4
		3	7,24	Multiplero	-
		4	7,87	Dupleto	8,6
		7	6,82	Singuleto	-
		11	3,81	Singuleto	-
		12	7,48	Tripleto	7,4
		13	7,33	Dupleto	6,9
		14	7,38	Tripleto	7,4
		NH <sub>2</sub>	5,20	Singuleto largo	-

A redução do grupo nitro a amina provocou alterações no comportamento magnético de todos os prótons da molécula, sendo que os prótons nas posições C2, C3, C7, C11 e C12 ficaram mais blindados e os prótons nas posições C4 e C13 ficaram ligeiramente mais desblindados.

O próton em C7, por ser aquele que está mais próximo do grupo amina, foi o que apresentou uma maior alteração no desvio químico.

A redução do grupo nitro a amina, no composto **33d**, fez com que os sinais dos prótons C12 e C14 deixassem de estar sobrepostos. Desta forma, os sinais dos prótons em C12 e C14 surgem agora como dois tripletos.

O sinal dos prótons do grupo amina aparece a 5,14 ppm (**33c**) e 5,20 ppm (**33d**) visto tratarem-se de aminas aromáticas. Em ambos os casos este sinal é um singuleto largo devido à baixa velocidade de troca dos prótons.<sup>[57]</sup>

Nos espectros de infravermelho dos compostos **33a – d**, além das bandas características do anel quinolínico, identificam-se ainda as bandas características de uma amina primária<sup>[57]</sup>. No composto **33a** existem duas bandas intensas a 3462,22 e 3385,07cm<sup>-1</sup>, no composto **33b** estas surgem a 3383,14 e 3145,9 cm<sup>-1</sup>, no composto **33c** aparecem a 3442,94 e 3165,19 cm<sup>-1</sup> e no composto **33d** estão a 3441,01 e 3363,86 cm<sup>-1</sup>.

#### 2.2.4. Síntese do Tetraoxano com a função ácido carboxílico (34)

Os tetraoxanos são compostos estáveis em condições básicas e ácidas e também face a agentes redutores<sup>[56]</sup>. Assim, para se sintetizar o composto **34** procedeu-se à hidrólise básica do grupo éster do composto **23**, de acordo com o descrito por Opsenica *et al*<sup>[56]</sup>. O composto **23** foi obtido usando as condições sintéticas descritas no ponto 2.1 quando se aborda a metodologia sintética dos híbridos tetraoxano-piridonimina.

O composto **34** foi obtido com um rendimento de 90% e foi caracterizado por <sup>1</sup>H RMN (**Figura 52**).

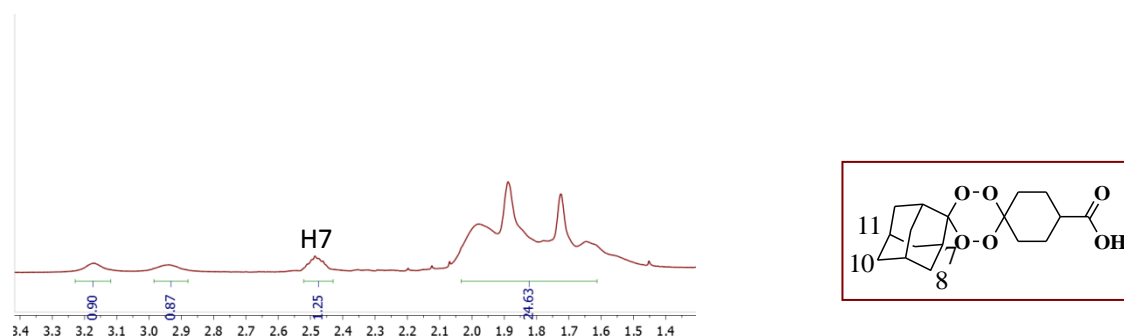


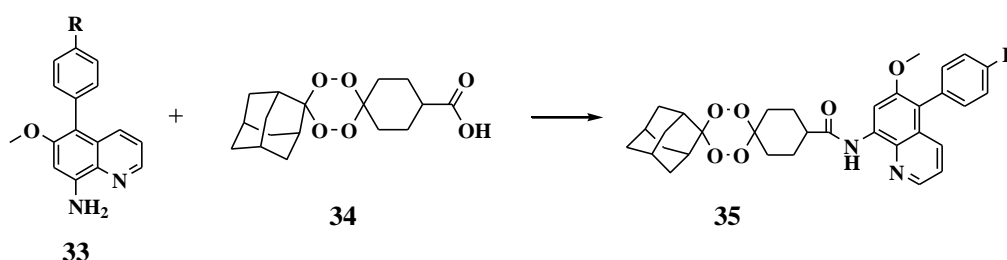
Figura 112 - Espectro <sup>1</sup>H RMN do composto **34**.



No espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto **34** pode-se observar apenas o sinal dos prótons do adamantano. Comparando os espectros dos compostos **23** (**Figura 25**) e **34** vê-se o desaparecimento dos sinais do grupo etilo do éster.

### 2.2.5. Síntese dos Compostos Híbridos (35a – d)

Para sintetizar os compostos híbridos com um *linker* amida (**35**) é necessário acoplar os intermediários **33** e **34** (**Esquema 3**).

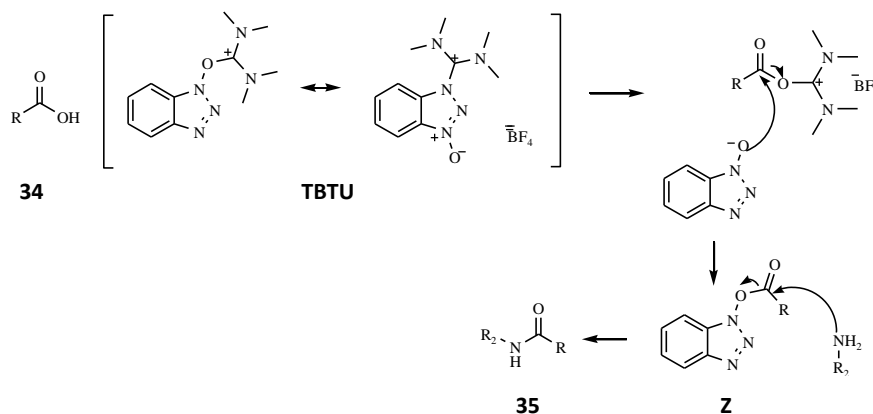


**Esquema 3:** Representação esquemática dos intermediários envolvidos na síntese dos híbridos **35**.

Contudo, dado que o derivado **34** é um ácido carboxílico e sua a reacção directa com uma amina é uma reacção ácido-base, e por isso, é necessário activar primeiro o ácido carboxílico. A activação de ácidos carboxílicos pode ser feita através de duas formas diferentes:

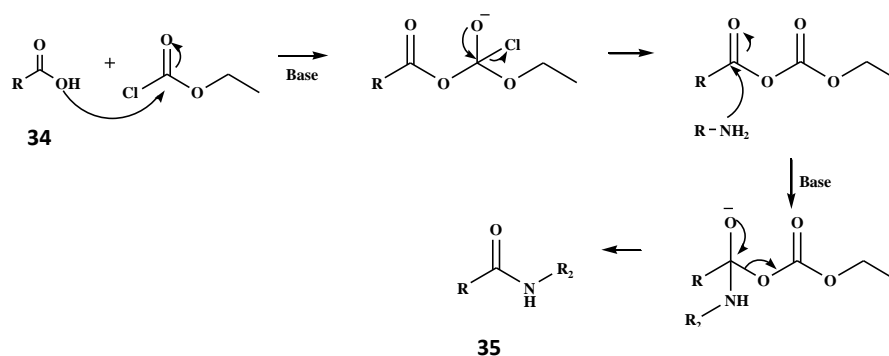
- Transformação do ácido carboxílico num grupo funcional mais reactivo como cloretos de ácidos, anidridos ou azidas;
- Uso de agentes de acoplamento como sais de urónio e fosfónio.

A primeira abordagem, na qual se transforma o ácido carboxílico num derivado mais reactivo tem como inconveniente o facto de o derivado sintetizado poder ser atacado pela água e ocorrer a sua hidrólise, novamente a ácido. Assim para obter os compostos **35** começou-se por activar o ácido carboxílico com o reagente de acoplamento tetrafluoroborato de O-(1H-benzotriazol-1-il)- N,N,N',N'-tetrametilurónio (TBTU) (**Figura 53**) <sup>[58, 69, 70]</sup>.



**Figura 113** - Mecanismo proposto para a síntese dos compostos **35** após activação do ácido carboxílico com o TBTU.

A síntese dos compostos **35** não foi possível após activação do composto **34** com o TBTU talvez porque o complexo composto **34** – TBTU (**Z**) apresenta um grande impedimento estérico e a amina, apesar de ser primária, é uma amina aromática logo menos reactiva que as alifáticas. Desta forma, para obter os híbridos **35** optou-se por converter o ácido carboxílico num composto mais reactivo, um anidrido, por reacção com o cloroformato de etilo, isto de acordo com a metodologia descrita por O'Neil *et al* <sup>[55]</sup> (**Figura 54**).



**Figura 114** - Mecanismo proposto para a síntese dos compostos **35** após conversão do ácido carboxílico num anidrido.

Após purificação por cromatografia em coluna, o composto **35a** foi obtido com um rendimento de 52%, o composto **35b** foi obtido com um rendimento de 51%, o composto **35c** foi obtido com um rendimento de 52% e o composto **35d** foi obtido com um rendimento de 58%. Todos os híbridos foram caracterizados por <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN, técnica bidimensional de COSY, HMBC,

HMQC, espectroscopia de infravermelho, espectrometria de massa de alta resolução e ponto de fusão. A pureza dos compostos **35** foi ainda avaliada por HPLC.

Dado que os espectros de RMN dos compostos híbridos **35a – d** são todos muito semelhantes, apresentam-se, abaixo os espectros do composto **35b** (Figura 55 e 56). Os desvios químicos de carbono do composto **35b** são apresentados na Tabela 8 e os dados espectroscópicos dos compostos **35a, c e d** estão sumariados na Tabela 9.

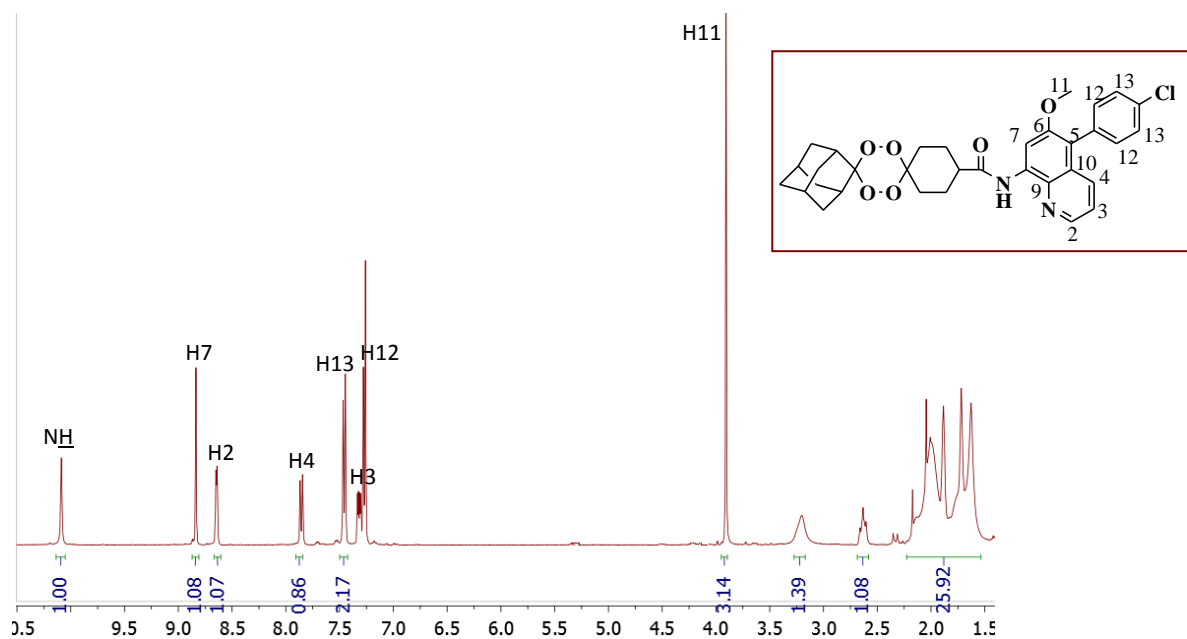


Figura 115 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto **35b**.

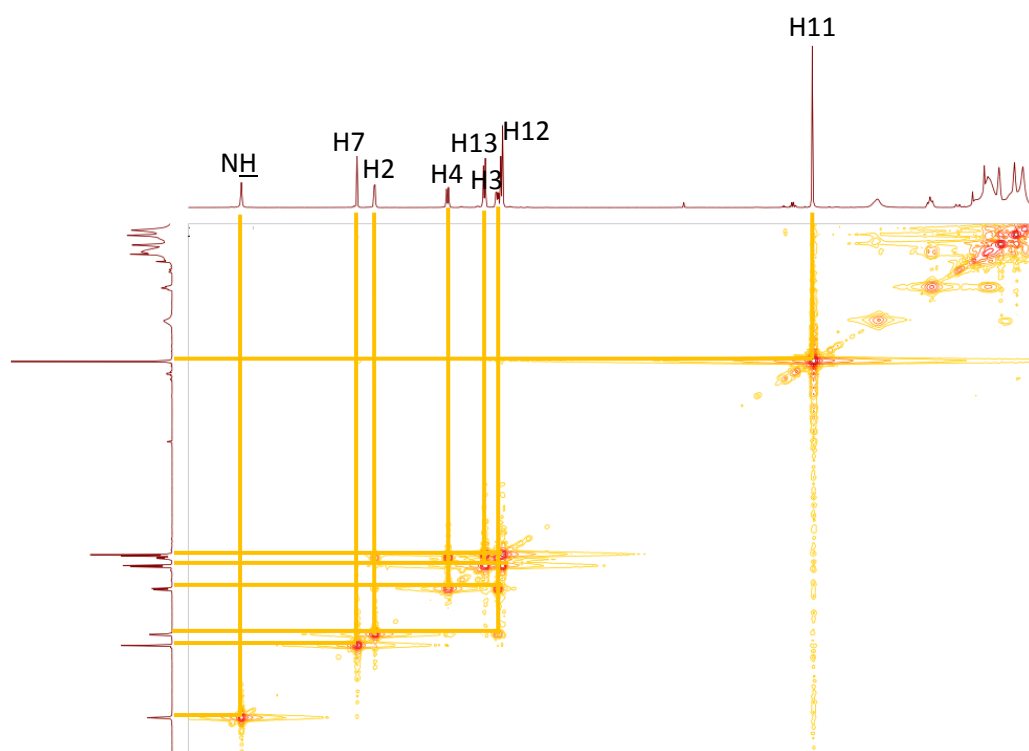


Figura 116 - Espectro COSY do composto **35b**.

**Tabela 8-** Desvio químico dos carbonos do composto **35b**.

Híbrido	Posição	Desvio químico do carbono/ ppm
<b>Tetraoxano</b>	Adamantano	27,199-45,486
<b>Quinolina</b>	C2	145,798
	C3	122,239
	C4	133,397
	C7	104,465
	C11	56,670
	C12	132,788
	C13	128,692
<b>Linker amida</b>	C=O	173,756

**Tabela 9** - Desvios químicos de carbono e prótão dos compostos **35a**, **c** e **d**.

Composto	R	Prótão/Carbono	$\delta_H$ / ppm	Tipo de Sinal	J/ Hz	$\delta_C$ / ppm
<b>35a</b>	<b>F</b>	Adamantano	1,61-2,20	Multiplete	-	27,28-45,65
			2,63	Tripleto	8,6	
			3,21	Singuleto	-	
		H2	8,64	Dupleto	3,6	145,82
		H3	7,30	Multiplete	-	133,03
		H4	7,85	Dupleto	8,4	122,45
		H7	8,84	Singuleto	-	107,28
		H11	3,91	Singuleto	-	56,82
		H12	7,17	Tripleto	8,6	115,56
		H13	7,30	Multiplete	-	133,69
		NH	10,09	Singuleto	-	-

		C=O	-	-	-	173,70
35c	Br	Adamantano	1,56-2,17	Multiplete	-	19,01-45,49
			2,63	Triplete	10,9	
			3,20	Singuleto	-	
		H2	8,64	Dupleto	2,8	145,82
		H3	7,32	Duplo Dupleto	8,6; 4,1	122,26
		H4	7,86	Dupleto	8,5	134,09
		H7	8,83	Singuleto	-	104,44
		H11	3,90	Singuleto	-	56,66
		H12	7,21	Dupleto	8,3	133,14
		H13	7,61	Dupleto	8,2	131,64
		NH	10,09	Singuleto	-	-
		C=O	-	-	-	173,62
35d	H	Adamantano	1,55-2,25	Multiplete	-	27,49-45,79
			2,64	Triplete	10,7	
			3,20	Singuleto	-	
		H2	8,64	Duplteto	2,8	146,02
		H3	7,41	Triplete	7,3	128,71
		H4	7,89	Dupleto	8,6	135,50
		H7	8,85	Singuleto	-	107,57
		H11	3,91	Singuleto	-	57,02
		H12	7,49	Triplete	7,3	127,72
		H13	7,33	Dupleto	8,0	131,68
		H14	7,30	Multiplete	-	122,35
		NH	10,10	Singuleto	-	-
		C=O	-	-	-	173,89

No espectro  $^1\text{H}$  RMN dos compostos **35** pode-se observar além dos sinais dos prótons da parte quinolínica da molécula, o aparecimento dos sinais dos prótons correspondentes à parte do tetraoxano. Comparando os espectros dos compostos **34** e **35** pode-se afirmar que o

comportamento magnético dos prótons do tetraoxano não foi afectado pela introdução do anel quinolínico. Por outro lado, os prótons das posições C3, C4 e C7 do anel quinolínico, apresentaram variações nos seus desvios químicos. Enquanto os prótons nas posições C4 e C7 estão mais desblindados, o próton na posição C3 mais blindado. O próton da amida apresenta-se muito mais desblindado que o referido na literatura para este tipo de prótons.<sup>[57]</sup>

Nos quatro espectros de infravermelho dos compostos híbridos **35** foi possível observar o aparecimento das bandas correspondentes ao tetraoxano e à amida. Enquanto as bandas dos tetraoxanos apareceram entre os 995,27-997,20 cm<sup>-1</sup> e os 1058,92-1172,72 cm<sup>-1</sup>, a banda correspondente às amidas surgiu entre os 1676,14 e os 1685,79 cm<sup>-1</sup>. Este valor é ligeiramente mais baixo que a frequência normal de absorção dos grupos carbonilo (1700 cm<sup>-1</sup>) e tal deve-se ao efeito de ressonância do grupo amida. O átomo de azoto da amida, por também ser electronegativo, acaba por provocar uma deslocalização dos eletrões  $\pi$  da ligação C=O, reduzindo o seu carácter de ligação dupla.

Para determinar a pureza dos compostos sintetizados fez-se a determinação do ponto de fusão e injecções em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) de uma solução de concentração 10mM dos vários compostos. Por espectrometria de massa de alta resolução foi possível observar o pico correspondente ao ião molecular dos compostos híbridos **35a – d (Tabela 10)**.

**Tabela 10** - Ião molecular, ponto de fusão e pureza dos compostos híbridos **35**.

Composto	R	[M+H]	Ponto de Fusão/ ° C	Pureza/ HPLC
<b>35a</b>	F	575,26	204-206	95%
<b>35b</b>	Cl	591,23	208-210	92%
<b>35c</b>	Br	637,17	212-214	96%
<b>35d</b>	H	557,27	184-186	97%

### 2.3. Síntese dos compostos híbridos tetraoxano-aminoquinolina com um *linker* amina

Depois de se sintetizarem os compostos híbridos tetraoxano-aminoquinolina com um *linker* amida (**35**) tentaram-se sintetizar os correspondentes compostos híbridos tetraoxano-aminoquinolina, agora com um *linker* amina. Para tal, começou-se por explorar a possibilidade de sintetizar os derivados desejados através de uma aminação redutiva. Este tipo de reacção baseia-se na adição nucleofílica de uma amina a um grupo carbonilo de um aldeído ou cetona

com formação de um intermediário carbinolamina que é desidratado e forma uma imina. A pH ligeiramente ácido, a imina é protonada e posteriormente reduzida, por um agente redutor à correspondente amina. A escolha do agente redutor é um passo determinante do sucesso desta reacção visto que este tem de reduzir selectivamente o ião imínio face a aldeídos presentes na mistura reaccional. Os agentes redutores mais utilizados são os hidretos ou a hidrogenação catalítica na presença de catalisadores como a platina, o paládio ou o níquel.

Na literatura existem diversas publicações que referem o uso de cianoborohidreto de sódio como agente redutor visto que este é bastante estável em soluções ácidas, solúvel em solventes próticos e ainda apresenta diferente selectividade em função do pH da mistura reaccional. Por exemplo, a pH 3-4 reduz efectivamente aldeídos e cetonas mas a valores de pH mais altos a reacção torna-se muito lenta, já a pH 6-8 as iminas são protonadas e rapidamente reduzidas a aldeídos ou cetonas.<sup>[71]</sup>

Por outro lado, o cianoborohidreto de sódio tem como limitações o facto de ser necessário um grande excesso da amina na mistura reaccional, a possibilidade de haver contaminação do produto com cianeto ou o facto da reacção de redução de aminas que são bases fracas ou de cetonas aromáticas ser muito lenta.

Para tentar ultrapassar estas limitações foram surgindo na literatura descrições do uso de agentes redutores como complexos de borano-piridina,  $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4/\text{NaBH}_3\text{CN}$ ,  $\text{Zn}/\text{AcOH}$ ,  $\text{NaBH}_4/\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2/\text{ZnCl}_2$  ou  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  nas reacções de aminação redutiva.

O triacetoxiborohidreto de sódio por ser um reagente suave e pela sua elevada selectividade foi o agente redutor seleccionado<sup>[58, 71]</sup>.

Para obter o tetraoxano com uma funcionalidade aldeído (**Composto 37**), sintetizou-se uma amida de *Weinreb* (**Composto 36**) a partir do tetraoxano com a função ácido carboxílico (**Composto 34**) de acordo com o procedimento descrito por Kim *et al*<sup>[72]</sup>. A amida de *Weinreb* foi posteriormente reduzida com hidreto de alumínio-lítio para se obter o tetraoxano aldeído (**Figura 57**).

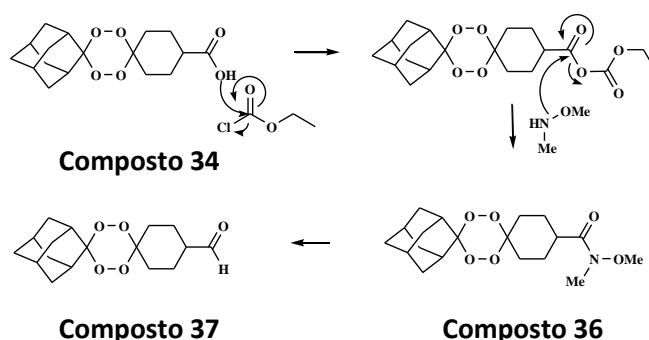
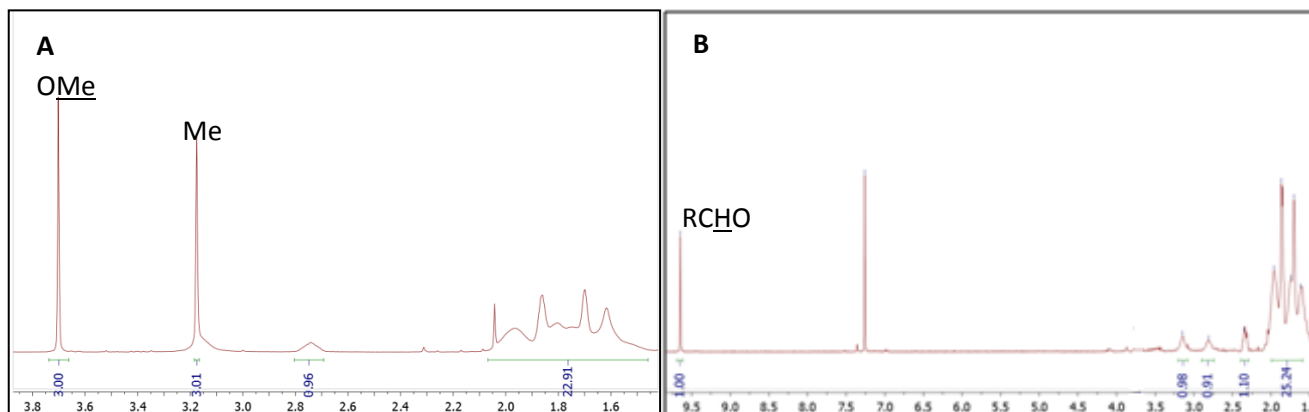


Figura 117 - Mecanismo proposto para síntese do tetraoxano com função aldeído (Composto 37).

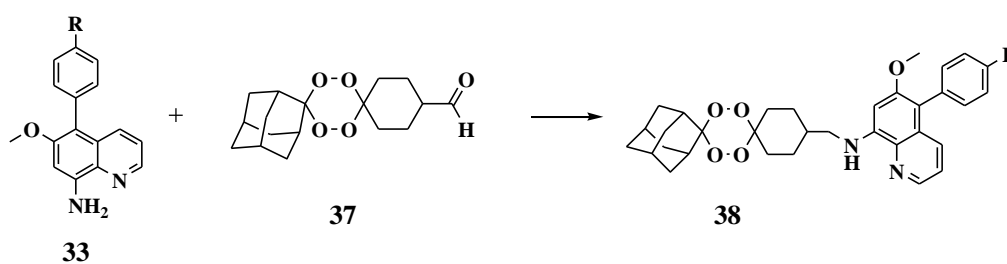
Os compostos **36** e **37** foram caracterizados por  $^1\text{H}$  RMN (**Figura 58**).



**Figura 118** – Espectros  $^1\text{H}$  RMN dos compostos **36** (A) e **37** (B).

Em ambos os espectros foi possível observar os sinais característicos do tetraoxano. No espectro de próton do composto **36** (**Figura 58 – A**) identificam-se ainda os sinais dos prótons dos grupos metilo (3,18ppm) e metoxilo (3,70 ppm) já no espectro do composto **37** (**Figura 58 – B**) além do desaparecimento dos sinais dos grupos metilo e metoxilo, observa-se o aparecimento de um pico a 9,65 ppm, característico de um aldeído.

Após se ter obtido o composto **37** tentou-se fazer uma aminação redutiva com o composto **33** (**Esquema 4**), previamente sintetizado de acordo com o acima referido, na presença de triacetoxiborohidreto de sódio, de acordo com o descrito por Abdel-Magid *et al* <sup>[71]</sup>.



**Esquema 4** – Representação esquemática da reação que permitiria obter os derivados **38** por aminação redutiva.

Contudo, não foi possível obter, por esta metodologia, os compostos híbridos tetraoxano-aminoquinolina com um *linker* amina (**38**).

Assim e com vista à obtenção dos novos compostos híbridos **38** tentou-se fazer uma reação de redução, na presença de hidreto de alumínio-lítio, do grupo amida do composto **35d**, previamente sintetizado. O composto obtido foi purificado por cromatografia em camada fina preparativa e caracterizado por  $^1\text{H}$  RMN (**Figura 59**).



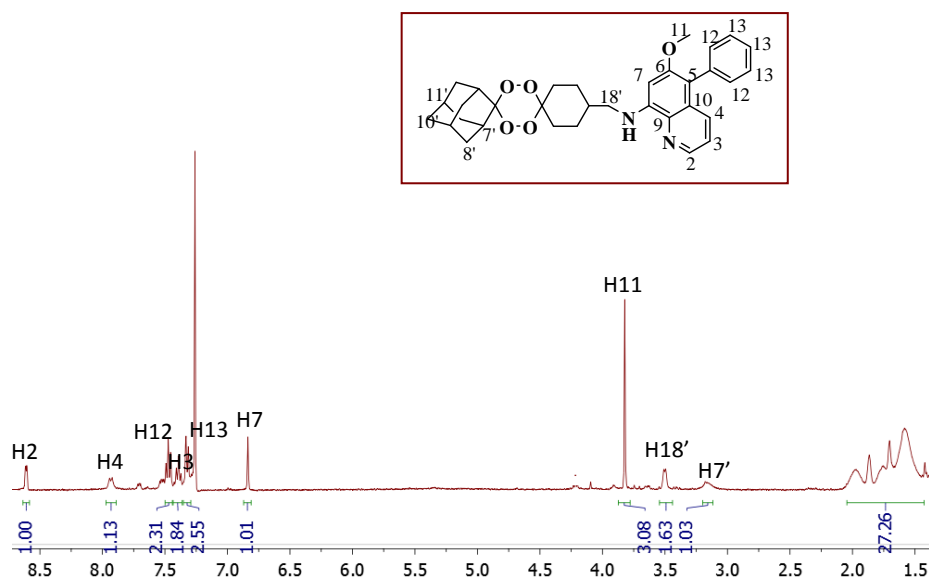


Figura 119 - Espectro <sup>1</sup>H RMN do composto híbrido 38.

Comparando os espectros de <sup>1</sup>H RMN do composto híbrido 35d com o 38 (Figura 59) pode-se observar o desaparecimento do pico correspondente ao grupo NH da amida que se encontrava a 10,10ppm. O próton em C7 por ser o mais próximo do *linker* é aquele que sofreu uma maior alteração no seu comportamento magnético, aparecendo agora muito mais blindado (6,84 ppm). Os prótons metilênicos da posição 18' dão origem a um novo sinal no espectro, um duplete a 3,50 ppm.

# Capítulo 3

## **Estabilidad e Actividade**

Actualmente muitos candidatos a fármacos falham nos ensaios clínicos por razões farmacocinéticas. As propriedades como a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) do composto são determinantes para o seu sucesso enquanto fármaco. A absorção e o metabolismo são os parâmetros farmacocinéticos mais importantes porque enquanto a primeira determina a taxa e transporte do lúmen gastro-intestinal para o sangue o segundo é muito importante no que diz respeito à biodisponibilidade. Assim, o screening *in vitro* destes parâmetros deve ser avaliado o mais cedo possível no processo de desenvolvimento de um novo medicamento. <sup>[73]</sup>

A estabilidade metabólica refere-se à percentagem de composto que é perdida ao longo do tempo, na presença de um sistema metabolicamente activo pelo que ensaios de estabilidade *in vitro* fornecem informações importantes como a taxa de metabolização do composto e quais os metabolitos produzidos em maior quantidade. Geralmente para determinar a estabilidade metabólica de um candidato a fármaco faz-se a quantificação dessa molécula, por HPLC, em sobrenadantes provenientes de misturas incubadas do composto com microsommas hepáticos. <sup>[74]</sup>

O HPLC é um tipo de cromatografia em coluna na qual a separação dos componentes da amostra está altamente optimizada devido não só à elevada pressão que existe no sistema, mas também às pequenas partículas usadas no empacotamento da coluna que permitem uma maior interacção entre a fase estacionária e a fase móvel. As colunas usadas em HPLC podem ser de fase normal ou de fase reversa, designação atribuída em função da polaridade da fase estacionária.

### 3.1 Avaliação da estabilidade metabólica dos compostos híbridos 35

Após a síntese dos compostos híbridos **35a – d** realizaram-se estudos de estabilidade metabólica em HPLC, sendo que para tal foi necessário conhecer previamente alguns parâmetros como o comprimento de onda em que o composto apresentava absorvência máxima e o tempo de retenção do híbrido.

#### 3.1.1 Determinação do Comprimento de Onda ( $\lambda$ )

Para definir o comprimento de onda a utilizar nos ensaios, traçaram-se espectros UV – visível de uma solução 0,033mM dos compostos híbridos **35a – d**, tendo-se obtido como máximo de absorção valores entre os 246,5 e os 249,5 nM. Visto os valores do máximo de absorção serem tão próximos para todos os compostos, usou-se o valor médio de 248nM para realizar os ensaios.

### 3.1.2 Eluente da coluna

A polaridade do eluente e o tipo de coluna do HPLC têm um papel preponderante na migração do composto ao longo da coluna e, consequentemente no tempo de retenção do mesmo. Neste estudo foi utilizada uma coluna de fase reversa, ou seja uma coluna que é constituída por uma matriz apolar, logo os compostos apolares são aqueles que ficam mais retidos por estabelecerem mais interações com a coluna. Neste tipo de sistema, para diminuir o tempo de retenção dos compostos de interesse, torna-se a fase móvel menos polar, ou seja, diminui-se a quantidade de água do eluente e aumenta-se a quantidade de solvente orgânico.

Quando os compostos têm grupos ionizáveis como aminas, amidas ou ácidos carboxílicos observam-se muitas vezes variações no tempo de retenção do composto entre injeções. Nestes casos, para fixar o tempo de retenção pode-se optar por adicionar um ácido forte como o ácido trifluoroacético (TFA) à mistura de eluentes ou substituir a água por tampão. <sup>[75]</sup>

Neste estudo começou-se por usar uma mistura MeOH:H<sub>2</sub>O nas proporções 95:5 como eluente, contudo observavam-se variações nos tempos de retenção entre as injeções. Desta forma, o eluente foi substituído, passando-se a usar uma mistura MeOH:H<sub>2</sub>O:TFA nas proporções 94:5:1, tendo-se obtido para os compostos **35a – d** os tempos de retenção indicados na **Tabela 11**.

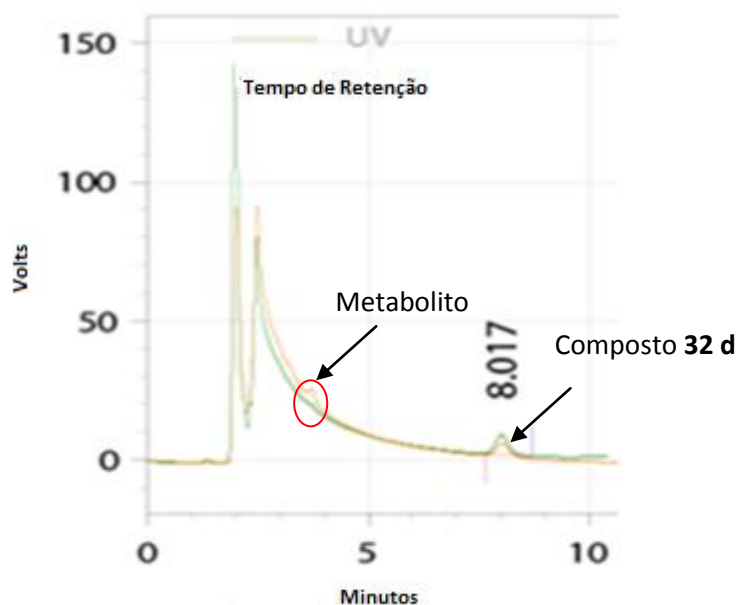
**Tabela 11** - Tempo de retenção dos compostos híbridos **35a – d**. Condições: coluna 4 LiChrospher®100 RP18, 5μM; Eluente: mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O: TFA nas proporções 94:5:1; λ= 248nm; Fluxo isocrático de 1ml/min.

Composto	R	Tempo de retenção (Tr)/ min
<b>35a</b>	<b>F</b>	7,88
<b>35b</b>	<b>Cl</b>	10,21
<b>35c</b>	<b>Br</b>	11,22
<b>35d</b>	<b>H</b>	8,02

Para realizar estudos de estabilidade metabólica é necessário começar por determinar a actividade dos microssomas ou das células hepáticas usadas nos estudos metabólicos dos compostos. A avaliação da capacidade de metabolização dos microssomas de fígado de rato usados nos ensaios de estabilidade dos compostos **35** foi efectuada através da quantificação do *p*-nitrocatecol, que resultou da conversão enzimática do *p*-nitrofenol pelo CYP2E1, de acordo com o descrito por Chang *et al* <sup>[76]</sup>.

O valor obtido, 1143,64 pmol/(min×mg), garante que os microssomas usados para determinar a estabilidade metabólica dos composto **35** não apresentavam perdas de actividade.

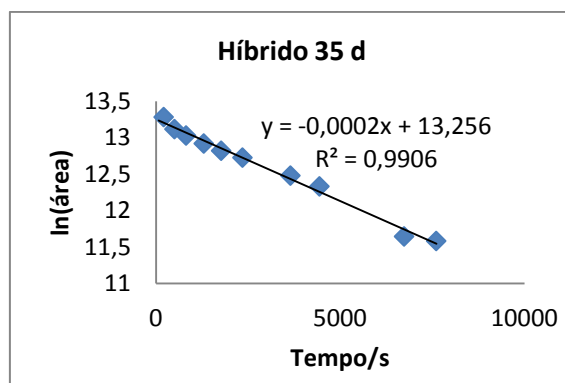
De seguida, iniciou-se o estudo da estabilidade metabólica dos compostos **35a – d** através da realização de ensaios metabólicos *in vitro*, em triplicado, de acordo com o protocolo do fornecedor. Neste tipo de ensaios segue-se o desaparecimento do pico correspondente ao composto sintetizado, sendo que, em alguns casos é ainda possível monitorizar o aparecimento de picos correspondentes aos metabolitos (**Figura 60**).



**Figura 120** – Sobreposição dos cromatogramas do composto **32 d** usando como eluente uma mistura MeOH:H<sub>2</sub>O:TFA nas proporções 94:5:1;  $\lambda$  = 248nm; Fluxo isocrático de 1ml/min. A verde está representada a injeção do tempo 0 min após o início do ensaio e a laranja a injeção do tempo 29 min após o início do ensaio.

### 3.2 Cálculo do tempo de meia-vida dos compostos híbridos 35a – d

Para calcular o tempo de meia-vida dos compostos híbridos **35** começou-se por fazer a representação gráfica da diminuição da concentração do composto ao longo do tempo (**Figura 61**).



**Figura 121** – Variação da concentração do composto **35d** na mistura reaccional, ao longo do tempo.

A constante de velocidade do consumo do composto **35d** ( $k$ ) é dada pelo declive da recta da **Figura 61**. De seguida, pela aplicação da **Equação 1** determina-se o tempo de meia-vida do composto. Os valores dos tempos de meia-vida obtidos para os compostos híbridos **35a – d** estão sumariados na **Tabela 12**.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Equação 1}$$

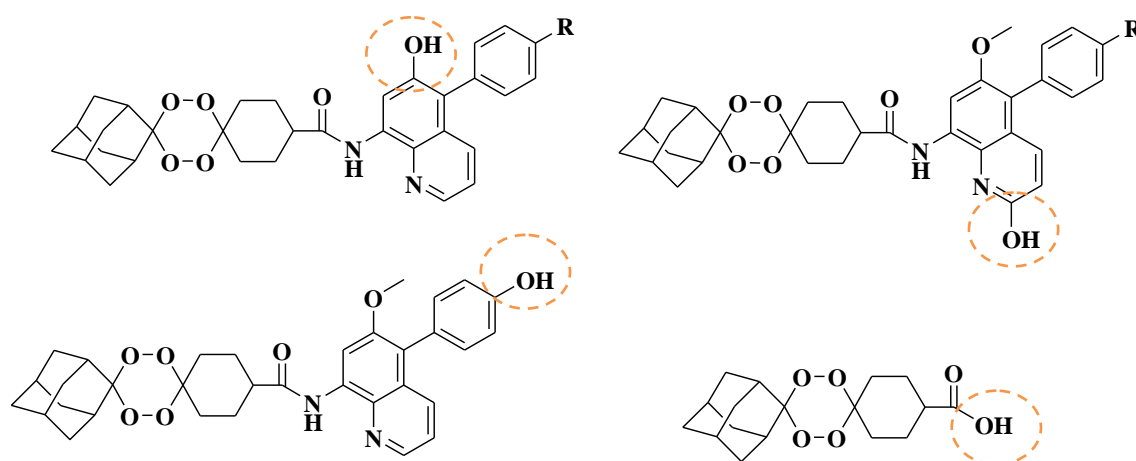
**Tabela 12** – Tempo de meia vida e constantes de velocidade dos compostos híbridos **35a – d** determinadas a partir da média dos três ensaios metabólicos efectuados.

Composto	R	Kobs / s <sup>-1</sup>	Tempo de meia-vida / min
<b>35a</b>	F	$1,96 \times 10^{-4} \pm 3,16 \times 10^{-5}$	60
<b>35b</b>	Cl	$9,30 \times 10^{-5} \pm 6,67 \times 10^{-6}$	125
<b>35c</b>	Br	$9,31 \times 10^{-5} \pm 4,15 \times 10^{-6}$	124
<b>35d</b>	H	$2,82 \times 10^{-4} \pm 5,02 \times 10^{-5}$	42

O composto **35d** é aquele que é mais extensamente metabolizado dado que cerca de 42 minutos são suficientes para que a sua concentração inicial se reduza a metade. A introdução de um átomo de halogénio no anel benzénico em C5 da quinolina originou compostos metabolicamente mais estáveis (compostos **35a – c**). Estes resultados estão de acordo com o esperado visto que a posição *para* de um anel benzénico é facilmente hidroxilada pelo CYP450.

Os compostos **35b** e **c** apresentam igual estabilidade metabólica, sendo que ambos são mais estáveis que o composto **35a**. Assim, a introdução de um átomo de halogénio permite obter compostos metabolicamente mais estáveis.

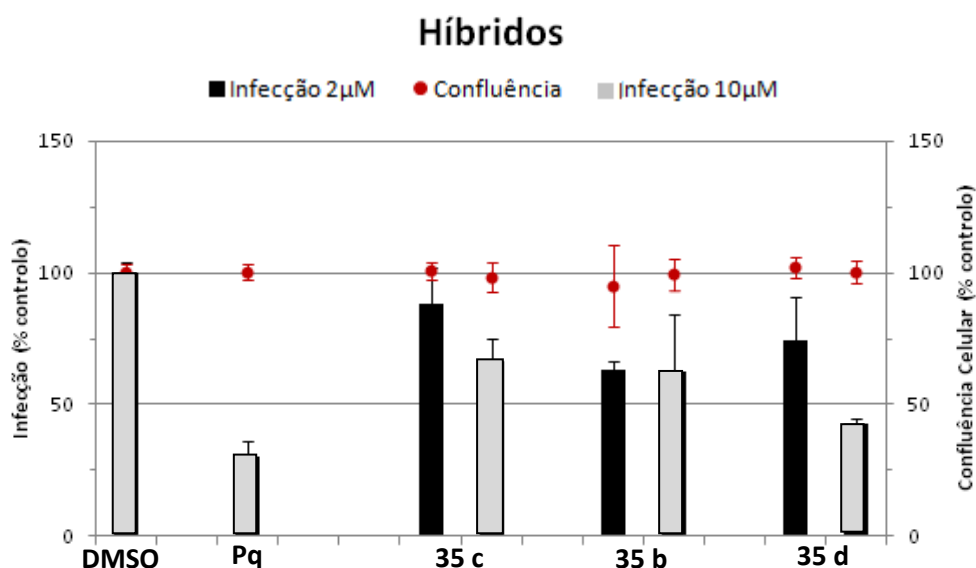
Os metabolitos resultantes da incubação dos compostos **35a – d** com microsomas podem ser identificados por espectrometria de massa. No entanto, observando a estrutura dos híbridos é possível prever quais as posições mais susceptíveis de metabolização e consequentemente alguns dos compostos originados (**Figura 62**).



**Figura 122** - Possíveis estruturas de metabolitos resultantes da incubação dos compostos **35a – d** com microsomas.

### 3.3 Actividade dos compostos híbridos **35b – d** na fase hepática da malária

O estudo da actividade dos compostos na fase hepática da malária foi feito no Instituto de Medicina Molecular. Para determinar a concentração de fármaco que inibe 50% do crescimento do parasita ( $IC_{50}$ ) dos compostos híbridos **35b**, **c** e **d** na fase hepática da doença, começou-se por fazer um *screening* com duas concentrações diferentes dos compostos, 2 e 10  $\mu M$ , em células de hepatoma humano, usando a primaquina como padrão (**Figura 63**).



**Figura 123** – Confluência celular e percentagem de infecção nas células de hepatoma incubadas com os compostos híbridos **35b – d**. Pq=primaquina e DMSO=dimetilsulfóxido.

Na **Figura 63** pode-se observar que os compostos **35**, nas concentrações testadas, apresentam baixa actividade, sendo menos activos que a primaquina. Desta forma, a cadeia lateral da primaquina parece ser essencial para a actividade antimalárica deste composto.

No que diz respeito aos compostos sintetizados, o composto **35d** é o mais activo, o **35b** apresenta uma actividade intermédia e o composto **35c** é o menos activo. Desta forma, a introdução de halogénios em *para* no anel benzénico em C5 da quinolina leva à obtenção de compostos menos potentes na fase hepática da malária. Tal pode dever-se às propriedades electronegativas dos elementos do grupo 17 ou até mesmo ao facto dos halogénios serem átomos grandes.

Em termos de toxicidade, nenhum dos compostos sintetizados parece ser nocivo para as células visto que os valores da confluência estão próximos de 100%.



### 3.4 Actividade dos compostos híbridos 35a – d na fase sanguínea da malária

Os ensaios biológicos que permitiram avaliar a actividade dos compostos **35a – d** contra a fase sanguínea de estirpes de *Plasmodium falciparum* W2, resistentes à cloroquina, foram efectuados na Universidade da Califórnia, em São Francisco, de acordo com o procedimento descrito por Coterón *et al* <sup>[78]</sup>. Os resultados obtidos foram expressos em valores de IC<sub>50</sub> e representam a média de pelo menos três ensaios experimentais (**Tabela 13**).

**Tabela 13** - Actividade esquizotocida sanguínea, determinada *in vitro*, peso molecular e ClogP da artemisinina (ART) e dos compostos híbridos **35a – d**.

Composto	R	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup> ± SD <sup>b</sup>	Peso Molecular	Clog P <sup>c</sup>
<b>35a</b>	F	916,25 ± 46,743	574,64	7,207
<b>35b</b>	Cl	4193 ± 202,23	591,09	7,721
<b>35c</b>	Br	5674 ± 430,6	635,54	7,852
<b>35d</b>	H	287,4 ± 15,13	556,65	7,043
<b>ART</b>	-	14,395 ± 1,66	282,00	2,900

<sup>a</sup> - Estirpe w2

<sup>b</sup>SD – Desvio padrão

<sup>c</sup>ClogP – ClogP é um valor calculado do logaritmo do coeficiente de partição entre o 1-octanol e a água, calculado através do software molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>). Os valores de logP medem a lipofilia dos compostos híbridos em estudos (valores mais altos atribuídos aos compostos mais lipofílicos).

Tendo em conta os valores de IC<sub>50</sub> obtidos pode-se concluir que os compostos híbridos **35a – d** apresentam baixa actividade inibitória do desenvolvimento dos parasitas na fase sanguínea, sendo que apresentam valores de IC<sub>50</sub> entre 20 a 400 vezes superiores ao controlo (ART). Mais uma vez a introdução de halogénios no anel benzénico em C5 da quinolina levou à obtenção de derivados menos potentes, dado que o composto **35d**, é o esquizotocida sanguíneo mais activo. Tal pode estar relacionado não só com as propriedades electrónicas e o tamanho dos halogénios mas também com o facto dos halogénios aumentarem a lipofilia e o peso molecular dos compostos **35**.

# Capítulo 4

## Conclusão

Atendendo aos resultados descritos no capítulo 2, a metodologia que permite obter os compostos híbridos baseados nos farmacóforos peróxido e piridona tem ainda de ser optimizada, nomeadamente no passo que envolve a reacção dos intermediários aminopiridina e tetraoxano.

Quanto aos híbridos que contemplam a união dos farmacóforos peróxido e 8-AQ através de um *linker* amida foi possível efectuar a sua síntese, purificação e caracterização.

Para obter os compostos híbridos baseados nos farmacóforos peróxido e 8-AQ unidos através de um *linker* amina é ainda necessário optimizar o método sintético pois apesar da redução dos compostos amida a amina parecer ser uma opção sintética, a mesma não é muito viável dado o rendimento da técnica ser baixo.

Tanto os compostos finais como os intermediários foram devidamente caracterizados pelas técnicas espectroscópicas de infravermelho (IV), espectroscopia de RMN unidimensional ( $^1\text{H}$  – RMN,  $^{13}\text{C}$  – RMN) e bidimensional (COSY, HMBC, HMQC) e ESI-MS. Desta forma, foi possível identificar os protões característicos das estruturas do tetraoxano, piridonas e quinolinas.

Os estudos efectuados em meio biológico, descritos no capítulo 3 que se destinaram a avaliar a estabilidade dos híbridos tetraoxano-5-arilo-6-metoxi-8-aminoquinolina com um *linker* amida sintetizados, permitem concluir que todos os compostos são metabolizados pelos microssomas hepáticos com tempos de meia-vida que variam entre os 42 e os 125 minutos. No entanto, a introdução de halogénios em *para* no arilo introduzido na posição 5 do anel quinolínico permite obter derivados com tempo de meia-vida superior.

Os resultados dos testes que avaliaram a actividade esquizontocida tecidular dos compostos híbridos revelaram que estes apresentam baixa actividade inibitória do crescimento dos parasitas *Plasmodium* na fase hepática da malária, isto quando comparados com a primaquina. Assim a remoção da cadeia aminoalquílica na posição 8 do anel quinolínico induz uma grande perda da actividade dos compostos comparativamente com os derivados com cadeia (dados não publicados).

Também os testes que avaliaram a actividade esquizontocida sanguínea dos compostos híbridos mostraram que os compostos sintetizados apresentam baixa actividade inibitória do crescimento dos parasitas *Plasmodium* na fase sanguínea da malária, isto quando comparados

com o controlo (ART). A introdução de halogénios em para no anel benzénico em C5 da quinolina induz perdas de actividade dos compostos em ambas as fases do ciclo infeccioso da malária. Tal pode dever-se às propriedades electrónicas dos elementos do grupo 17, tamanho dos halogénios ou até mesmo ao aumento tanto do peso molecular como do logP dos híbridos sintetizados.

# Capítulo 5

## **Procedimiento** **Experimental**

## 5. Reagentes e solventes

### 5.1 Reagentes

Os reagentes utilizados no decorrer da parte experimental foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, Alfa Aesar e Merck.

A trietilamina (Sigma-Aldrich) foi destilada de hidróxido de potássio em lentilhas e armazenada em frascos escuros com *molecular sieves*.

O tampão fosfato (pH 7,4, 0,5 M) foi preparado dissolvendo-se 68,045g de fosfato de potássio em 1l de água desionizada. O pH foi acertado com NaOH 5M.

Os microsomas de fígado de rato foram fornecidos pela BD GentestTM.

### 5.2 Solventes

Na síntese de todos os compostos foram utilizados solventes de grau analítico (p.a.).

Todos os solventes foram destilados á pressão atmosférica. O tetrahydrofurano (THF) da Panreac e o éter etílico (Et<sub>2</sub>O) foram previamente secos com refluxo, na presença de fio de sódio e benzofenona (Merck), usada como indicador de humidade. O diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e o metanol (MeOH) foram destilados de cloreto de cálcio anidro.

O acetato de etilo e o metanol que se destinavam à purificação de compostos foram destilados de carbonato de sódio.

Nos estudos de estabilidade por HPLC, utilizaram-se solventes Lichrosolv® da Merck e água desionizada obtida através da passagem de água bidestilada numa resina de troca iónica Millipore, sendo recolhida com uma resistividade de 18 mΩ cm-1.

Os solventes deuterados utilizados para RMN (CDCl<sub>3</sub>, MeOD e DMSO-d) e o tetrametilsilano eram da Merck, com um grau de pureza superior a 95%.

### 5.3 Cromatografia

Todas as colunas de cromatografia foram preparadas com sílica gel 60 M de granulometria 0,040-0,063 mm (Merck). As cromatografias em camada fina foram realizadas em placas de sílica-gel Merck Kieselgel F254, de espessura 0,25 mm, e reveladas usando uma câmara CAMAG de UV, com um comprimento de onda de 254 nm, uma câmara de iodo ou um dos seguintes reveladores: N,N-dimetilparadifenilenodiamina e *p*-anisalaldeído.

#### 5.4 Equipamento

Os pontos de fusão foram determinados numa câmara Kofler Bock Monoscop M.

Os espectros de infravermelho (IV) foram executados num espectrofotómetro Nicolet Impact 400 FTIR sob a forma de filme em células de cloreto de sódio ou sob a forma de pastilhas de brometo de potássio.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão ( $^1\text{H}$ -RMN) e de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) foram traçados num espectrómetro *Bruker 400 Ultra-Shield*. Os valores de desvio químico,  $\delta\text{H}$  ou  $\delta\text{C}$ , são apresentados em ppm relativamente ao TMS e as constantes de acoplamento (J) estão em Hz.

Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, com um espectrofotómetro de massa Micromass Quattro Micro API, com fonte de ionização por electrospray. O programa de interpretação dos resultados da análise foi o MassLynx V4.1.

Os espectros de massa de alta resolução foram efectuados na Universidade de Santiago Compostela, Espanha, com um espectrofotómetro de massa quadrupolar da Hewlett-Packard, modelo HP5988A, por impacto electrónico.

Para determinar qual o melhor comprimento de onda a utilizar nos estudos por HPLC utilizou-se um espectrofotómetro de UV-Visível feixe duplo Shimadzu UV-2100PC, acoplado a um sistema de aquecimento termostatado da Shimadzu CPS-260.

Os estudos de estabilidade foram realizados num sistema de HPLC, utilizando um detector espectrofotométrico UV-visível Shimadzu SPD-6AV, de comprimento de onda variável, acoplado a uma bomba Lachrom Merck-Hitachi L-7100, com um injector Rheodyne de 20  $\mu\text{l}$ , um registador Chromato-Integrator Merck-Hitachi D2500A e coluna Merck Lichrocart® RP-18, 250×4 mm, com partículas de 5  $\mu\text{m}$ . Adicionalmente foi usada, durante os ensaios, uma centrífuga SIGMA 112 (13000 rpm), um vortex Genie™, Modelo K-550-GE, Scientific Industries, Inc e um banho Julabo MP com refrigerante Julabo F12 incorporado, para termostatar as soluções reaccionais.

Para a leitura do pH das soluções foi utilizado um potenciómetro micro pH 2002 *Crison*.

## **5.5 Síntese e caracterização de compostos**

### **5.5.1 Compostos híbridos tetraoxano - piridonimina**

#### **5.5.1.1. Composto 23: Tetraoxano éster**

A uma solução em agitação de 4-oxociclohexanocarboxilato de etilo (1 g; 5,88 mmol) em acetonitrilo (8 mL) e ácido fórmico (8 mL) a 0 °C adicionou-se peróxido de hidrogénio a 50% (4 mL). Após cerca de 2 h em agitação à temperatura ambiente, fez-se uma nova recarga de peróxido de hidrogénio a 50% e a mistura reaccional foi diluída com água e extraída com diclorometano. As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas a pressão reduzida para depois serem adicionadas a uma solução de 2-adamantanona (1,43 g; 9,4 mmol) em diclorometano seco (10 mL) com óxido de rénio (63 mg; 0,13 mmol) previamente estabilizada a 0 °C. A formação do produto foi seguida por cromatografia em camada fina e cerca de 2 h depois a mistura reaccional foi filtrada a vácuo com *plug* de sílica e o solvente evaporado. A purificação por cromatografia em coluna com sílica (4:96 acetato de etilo/ *n*-hexano) permitiu obter o produto da reacção, um sólido branco, com um rendimento de 49%. Ponto de fusão: 67°C – 69 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,13 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,15 (s, 1H), 2,91 (s, 1H), 2,40 (s, 1H), 2,06 – 1,57 (m, 23H), 1,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  1734,01 cm<sup>-1</sup>, 1060,95 cm<sup>-1</sup>, 996,77 cm<sup>-1</sup>.

#### **5.5.1.2. Composto 24: Tetraoxano álcool**

À solução do tetraoxano éster, composto **23**, (1,23 g; 3,5 mmol) em éter seco (12 mL) a 0 °C adicionou-se hidreto de alumínio-lítio (0,22 g; 5,95 mmol). A formação do produto foi seguida por cromatografia em camada fina e após cerca de 15 minutos a mistura reaccional foi diluída com água e extraída com acetato de etilo. De seguida, acidificou-se a fase aquosa até pH 2 com HCl 1M e fizeram-se extracções com acetato de etilo. As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida. O produto da reacção, um óleo incolor, foi obtido com um rendimento de 83%. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,89 (s, 1H), 3,51 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,17 (s, 2H), 2,13 – 1,60 (m, 26H). ESI(+) *m/z*= 328,16; 349,01 [M+NH<sub>4</sub>], [M+K]. Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  3250 cm<sup>-1</sup>, 1051,2 cm<sup>-1</sup>, 997,2 cm<sup>-1</sup>.

#### **5.5.1.3. Composto 25a: Tetraoxano mesilato**

A uma solução do derivado álcool, composto **24**, (0,9 g; 2,9 mmol) em THF seco (68 mL) e trietilamina destilada (2,02 mL; 15 mmol) adicionou-se, gota a gota, cloreto de metanossulfonato (0,9 mL; 12 mmol). A mistura reaccional foi deixada em agitação a 50 °C e



após 14 h observou-se a formação de um precipitado amarelo-acastanhado. O solvente foi evaporado e a mistura reaccional foi purificada por cromatografia em coluna com sílica (20:80 acetato de etilo / *n*-hexano). O produto da reacção, um sólido branco, foi obtido com um rendimento de 61%. Ponto de fusão: 105 °C – 107 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,09 (s, 2H), 3,18 (s, 1H), 3,03 (s, 1H), 2,09 – 1,46 (m, 26H). ESI (+) *m/z*= 411,07; 427,06 [M+Na], [M+K]. Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  2858,51 cm<sup>-1</sup>, 1350, 81 cm<sup>-1</sup>, 1174,65 cm<sup>-1</sup>, 1062,68 cm<sup>-1</sup> e 975,98 cm<sup>-1</sup>.

#### 5.5.1.4. Compostos 28a – d: Bifenilaminopiridinas

##### Método A

A uma solução de piridina (0,68 mmol) e de 4-aminobifenilo (0,75 mmol) em etanol absoluto ou metanol anidro (3,5ml/ mmol) adicionou-se trietilamina (0,68 mmol), de seguida, a mistura reaccional foi sujeita a refluxo.

##### Método B

A uma solução de piridina (0,27 mmol) em N-metilpirrolidona (NMP) (2ml) adiciona-se 4-aminobifenilo (0,54 mmol) e trietilamina (0,54 mmol). A mistura reaccional foi sujeita a por micro-ondas (250 °C, 300 psi) por um período de 2 h. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, adicionou-se uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio à mistura reaccional e fizeram-se extracções acetato de etilo-água. As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com uma solução saturada de cloreto de sódio, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida. O produto da reacção foi purificado por cromatografia em coluna, com sílica (4:96-5:95 – acetato de etilo/ *n*-hexano).

##### Método C

A uma mistura em agitação de acetato de paládio (4,92 mg; 0,002 mol%), carbonato de cério (250mg; 0,77 mmol), (+/-) binap (13,64 mg; 0,022 mmol) em tolueno (3,2ml) em atmosfera de N<sub>2</sub>, adicionou-se 3,4,5-tricloropiridina (100 mg; 0,55 mmol) e 4-aminobifenilo (93 mg; 0,55 mmol). A mistura reaccional foi sujeita a refluxo (90 °C) e o consumo do material de partida monitorizado por cromatografia em camada fina. Ao fim de aproximadamente 24 h, o meio reaccional foi filtrado com um *plug* de celite. O *plug* foi lavado com acetato de etilo e o solvente da mistura reaccional foi evaporado. O produto da reacção foi purificado por cromatografia em coluna com sílica (5:95 acetato de etilo/ *n*-hexano).

### **Método D**

Num tubo de ensaio seco colocou-se acetato de paládio (0,21 mg; 0,0935 mmol%) e  $(C_6H_5)_2P(C_6H_{11})_2$  (1 mg; 0,00493 mmol) e depois de encher o tubo com azoto injectou-se dioxano seco (1,56 ml) e água desgaseificada (0,68 µl; 0,04 mmol). O catalisador foi activado a 80 °C por um minuto e injectado noutro tubo de ensaio que continha NaOtBu (180 mg; 1,87 mmol), 3-amino-4-cloropiridina (200 mg; 1,1 mmol) e 4-aminobifenilo (317,28 mg; 1,88 mmol). A mistura reaccional foi aquecida a 110 °C e a formação de produto monitorizada por cromatografia em camada fina, sendo que se fizeram recargas de NaOtBu (66,2 mg; 0,69 mmol) passadas 4 h e de catalisador activado ao fim de 4h 20min (0,36 mg; 0,16 mmol% acetato de paládio, 1,7 mg; 0,0084 mmol  $(C_6H_5)_2P(C_6H_{11})_2$ , 0,6 µl H<sub>2</sub>O; 0,035 mmol e 1,6 ml Dioxano) e 21h (3,6 mg; 1,6 mmol% acetato de paládio, 170 mg; 0,84 mmol  $(C_6H_5)_2P(C_6H_{11})_2$ ; 120 µl, 0,07 mmol H<sub>2</sub>O e 1,6 ml Dioxano).

#### **5.5.1.4.1. Composto 28a: 4-Bifenilaminopiridina**

O composto **28a** foi sintetizado pelo método A e obtido pela adição de acetato de etilo à mistura reaccional, após 23 h de refluxo, o que induziu a sua precipitação. Após filtração obteve-se um sólido amarelo, com um rendimento de 92%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8,20 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 7,79 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,67 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,47 (dd, *J* = 17,0, 8,1 Hz, 4H), 7,39 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 7,19 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H). ESI(+) *m/z* = 247,09 [M+H].

#### **5.5.1.4.2. Composto 28b: Bifenil-3,5-dicloroaminopiridina**

O composto **28b** foi sintetizado pelos métodos B e C. Este foi obtido como um sólido branco amarelado com um rendimento de 5% pelo método B e com um rendimento de 29% pelo método C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,39 (s, 2H), 7,57 (dd, *J* = 14,8, 8,0 Hz, 4H), 7,44 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,34 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,01 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 6,47 (s, 1H).

#### **5.5.1.4.3. Composto 28c: Bifenil-3,4-diaminopiridina**

Não foi possível sintetizar o composto **28c** por nenhum dos métodos utilizados.

#### **5.5.1.4.4. Composto 28d: 4-Bifenil-3-nitroaminopiridina**

O composto **28d** foi sintetizado pelo método A após cerca de 7 h de refluxo da mistura reaccional. O produto da reacção foi filtrado e lavado com *n*-hexano e obtido como um sólido laranja com um rendimento de 87%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,74 (s, 1H), 9,32 (s, 1H), 8,28

(d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 7,70 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,61 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 7,48 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 7,39 (dd,  $J = 15,2, 7,7$  Hz, 3H), 7,05 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H).

#### 5.5.1.5. Composto 29a: Híbrido tetraoxano-bifenilaminopiridina

##### Método A

A aminopiridina (32 mg; 0,13 mmol) em solução em dimetilformamida (DMF) foi activada por 1 h com uma suspensão oleosa de hidreto de sódio a 60% (6,19 mg; 0,15 mmol). De seguida, esta solução foi injectada gota-a-gota, numa solução do mesilato de tetraoxano, composto **25**, (50 mg; 0,129 mmol) em DMF, estabilizada a 0° C. A mistura reaccional foi deixada em agitação à temperatura ambiente e após cerca de 26 h, esta foi diluída com água e extraída com acetato de etilo. As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida. Após purificação por cromatografia em coluna com sílica (30:3:67 acetato de etilo/trietilamina/*n*-hexano) obteve-se o produto da reacção, um óleo castanho, com um rendimento de 11%. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,20 (s, 2H), 7,68 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 7,63 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 7,49 (t,  $J = 7,6$  Hz, 3H), 7,40 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 7,30 (s,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 6,60 (d,  $J = 4,6$  Hz, 2H), 3,67 (d,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,17 (s, 2H), 2,08 – 1,41 (m, 29H). <sup>13</sup>C RMN (100,61 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  147,73, 143,82, 140,21, 129,12, 127,83, 127,70, 127,17, 110,75, 108,70, 107,81, 57,64, 8,31- 37,05. ESI (+)  $m/z = 539, 24$  [M+H].

##### Método B

A uma solução do tetraoxano álcool, composto **24**, (90mg; 0,28 mmol) em diclorometano anidro (2,8 ml), em agitação sob atmosfera de N<sub>2</sub> a -20 °C, adicionou-se 2,6 dimetilpiridina (41,1  $\mu$ l; 0,35 mmol). De seguida, injectou-se, gota-a-gota, o anidrido trifílico (51,8  $\mu$ l; 0,28 mmol). A evolução da reacção foi seguida por cromatografia em camada fina e após cerca de duas horas fez-se uma nova recarga de anidrido (10  $\mu$ l; 0,05 mmol). Cerca de 30 minutos depois injectou-se, gota-a-gota, na mistura reaccional uma solução da aminopiridina (69 mg; 0,28 mmol) em DMF (2ml), previamente activada durante 30min com hidreto de sódio (6,72 mg; 0,16 mmol). A reacção foi deixada em agitação, à temperatura ambiente e a formação de produto foi monitorizada por cromatografia em camada fina. Cerca de 14 h depois juntou-se à mistura reaccional uma solução saturada de cloreto de sódio e fizeram-se extracções com acetato de etilo. Após purificação por cromatografia em coluna com sílica (30:64:6 – 50:40:10 acetato de etilo/*n*-hexano/trietilamina) não foi possível obter o produto.

### 5.5.2 Compostos híbridos tetraoxano-aminoquinolina

#### 5.5.2.1. Composto 31: 5-bromo-6-metoxi-8-nitroquinolina

A uma mistura de 6-metoxi-8-nitroquinolina (1 g; 4,9 mmol), carbonato de cálcio (373,5 mg; 3,73 mmol) e limalha de ferro (24 mg; 0,46 mmol) adicionou-se água (1ml), clorofórmio (5ml) e bromo (1 ml; 19 mmol). A suspensão foi sujeita a refluxo (68 °C) por 15 h, tendo posteriormente permanecido 6 h à temperatura ambiente. Para remover o excesso de bromo a suspensão foi tratada com uma solução de bissulfito de sódio a 5%. Por fim, fizeram-se extracções com acetato de etilo, as fases orgânicas foram lavadas com uma solução saturada de cloreto de sódio e secas com sulfato de sódio anidro. Após concentração do produto a pressão reduzida obteve-se um sólido amarelo-torrado com um rendimento de 70%. Ponto de fusão: 205°C - 208°C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,96 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 8,63 (dd, J = 8,7, 1,4 Hz, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,60 (dd, J = 8,7, 4,1 Hz, 1H), 4,11 (s, 3H). Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  1507-1281 cm<sup>-1</sup>, 1300-1000 cm<sup>-1</sup>, 1256 cm<sup>-1</sup>, 953cm<sup>-1</sup>.

#### 5.5.2.2. Compostos 32a – d: 5-Arilo-6-metoxi-8-nitroquinolina

##### Método A

A uma solução em agitação de 5-bromo-6-metoxi-8-nitroquinolina, composto **31**, (150 mg, 0,53 mmol) em dioxano seco (9 ml) adicionou-se PdCl<sub>2</sub>P(Ph<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (10 mol%), deixando-se a mistura em agitação sob atmosfera de N<sub>2</sub> por 10 min. De seguida, juntou-se à mistura reaccional Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (518 mg, 1,59 mmol) e o ácido borónico (0,64 mmol). A mistura reaccional foi sujeita a refluxo por um período de cerca de 19 h e o produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna com sílica (0:100 – 12:88 acetato de etilo/ *n*-hexano).

##### Método B

Utilizou-se o procedimento de síntese descrito no método A mas a base foi substituída por uma solução 0,2 M de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8 ml, 0,159 mmol).

##### Método C

A uma solução do composto **31** (363 mg, 1,28 mmol) em Dimetoxietano (11 ml) adicionou-se acetato de paládio (7 mol%), trifenilfosfina (46 mg, 0,17 mmol), brometo de tetrabutilamónio (84 mg, 0,26 mmol), ácido borónico (1,7 mmol) e uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3M (853 µl, 2,56 mmol). A suspensão foi sujeita a refluxo (100°C) por 39h, sendo que ao fim de 23h se fez uma recarga de brometo de tetrabutilamónio (64,5 mg, 0,2 mmol). A reacção foi parada com a

adição de uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e fizeram-se extracções com clorofórmio. As fases orgânicas foram lavadas com uma solução saturada de cloreto de sódio, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida. Após purificação por cromatografia em coluna com sílica usando como eluente uma mistura clorofórmio/hexano/acetato de etilo (1:1:0 até 45:45:10) obteve-se o produto.

#### **5.5.2.2.1. Composto 32a: 5-fluorfenilo-6-metoxi-8-nitroquinolina**

O composto **32a** foi obtido como um sólido alaranjado com rendimentos entre os 22% e os 66%, consoante foi sintetizado pelo método A, B ou C. Ponto de fusão: 248°C - 250°C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,93 (dd,  $J = 4,0, 1,5$  Hz, 1H), 7,94 – 7,88 (m, 2H), 7,40 (dd,  $J = 8,7, 4,1$  Hz, 1H), 7,30 (dd,  $J = 8,3, 5,9$  Hz, 2H), 7,22 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 3,92 (s, 3H). Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  1591  $\text{cm}^{-1}$ , 1256  $\text{cm}^{-1}$ , 1247,94  $\text{cm}^{-1}$ , 1180,44  $\text{cm}^{-1}$ , 1132,21  $\text{cm}^{-1}$ , 1072,42  $\text{cm}^{-1}$ , 908,5  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **5.5.2.2.2 Composto 32b: 5-clorofenilo-6-metoxi-8-nitroquinolina**

O composto **32b** foi obtido como um sólido alaranjado com rendimentos entre os 25% e os 63%, consoante foi sintetizado pelo método A, B ou C. Ponto de fusão: 265°C - 267°C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,96 (d,  $J = 3,4$  Hz, 1H), 7,92 (d,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 7,54 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,42 (dd,  $J = 8,7, 4,0$  Hz, 1H), 7,29 (d,  $J = 5,8$  Hz, 2H), 3,95 (s, 3H). Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  1465,9  $\text{cm}^{-1}$ , 1369,5  $\text{cm}^{-1}$ , 1130  $\text{cm}^{-1}$ , 1072,42  $\text{cm}^{-1}$ , 912,33  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **5.5.2.2.3. Composto 32c: 5-bromofenilo-6-metoxi-8-nitroquinolina**

O composto **32c** foi obtido como um sólido alaranjado com rendimentos entre os 22% e os 86%, consoante foi sintetizado pelo método A, B ou C. Ponto de fusão: 242°C - 246°C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,96 (dd,  $J = 5,3, 1,3$  Hz, 1H), 7,95 – 7,89 (m, 2H), 7,70 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 7,42 (dd,  $J = 8,7, 4,2$  Hz, 1H), 7,23 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 3,94 (s, 3H). Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  1255,66  $\text{cm}^{-1}$ , 1128,36  $\text{cm}^{-1}$ , 1074  $\text{cm}^{-1}$ , 912,33  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **5.5.2.2.4. Composto 32d: 5-fenilo-6-metoxi-8-nitroquinolina**

O composto **32d** foi obtido como um sólido alaranjado com rendimentos entre os 46% e os 86%, consoante foi sintetizado pelo método A, B ou C. Ponto de fusão: 184°C - 186°C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,93 (dd,  $J = 4,0, 1,5$  Hz, 1H), 7,97 – 7,90 (m, 2H), 7,52 (dq,  $J = 14,5, 7,1$  Hz, 3H), 7,38 (dd,  $J = 8,7, 4,1$  Hz, 1H), 7,32 (dd,  $J = 6,5, 1,6$  Hz, 2H), 3,92 (s, 3H). Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  1255,66  $\text{cm}^{-1}$ , 1130,29  $\text{cm}^{-1}$ , 1072,42  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.5.2.3. Compostos 33a – d: 5-arilo-6-metoxi-8-aminoquinolinas

A uma suspensão dos compostos **33a – d** (393 mg; 1,1 mmol) em HCl 37% (6,6ml), em agitação a 0 °C, adicionou-se SnCl<sub>2</sub> (4,4 mmol) e estanho (0,33 mmol). A formação do produto foi seguida por cromatografia em camada fina e após cerca de 1h, adicionou-se uma solução de NaOH 8M até pH 14 à mistura reaccional. De seguida, a mistura reaccional foi diluída com água e extraída com acetato de etilo. As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com uma solução saturada de cloreto de sódio, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica (0:100 – 20:80 acetato de etilo/ *n*-hexano).

#### 5.5.2.3.1. Composto 33a: 5-Fluorfenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina

O composto **33a** foi obtido como um sólido castanho alaranjado com um rendimento de 62%.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,61 (dd, *J* = 5,6, 1,4 Hz, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,36 – 7,27 (m, 3H), 7,16 (t, *J* = 8,7 Hz, 2H), 6,83 (s, 1H), 3,83 (s, 3H). Infravermelho: ν<sub>máx</sub> 3462 cm<sup>-1</sup>, 3385 cm<sup>-1</sup>, 1232,51 cm<sup>-1</sup>, 1070,49cm<sup>-1</sup>.

#### 5.5.2.3.2. Composto 33b: 5-Clorofenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina

O composto **33b** foi obtido como um sólido amarelo com um rendimento de 54%.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,61 (dd, *J* = 5,2, 1,3 Hz, 1H), 7,94 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,44 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,33 (dd, *J* = 8,4, 4,7 Hz, 1H), 7,24 (s, 2H), 6,84 (s, 1H), 3,83 (s, 3H). Infravermelho: ν<sub>máx</sub> 3383 cm<sup>-1</sup>, 3146 cm<sup>-1</sup>, 1404,18 cm<sup>-1</sup>, 1089,78 cm<sup>-1</sup>, 923,9cm<sup>-1</sup>.

#### 5.5.2.3.3. Composto 33c: 5-bromofenilo-6-metoxi-8-aminoquinolinas

O composto **33c** foi obtido como um sólido castanho alaranjado com um rendimento de 79%.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,59 (dd, *J* = 5,1, 1,2 Hz, 1H), 7,78 (dd, *J* = 8,6, 1,4 Hz, 1H), 7,58 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,24 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 7,21 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 6,78 (s, 1H), 5,14 (s, 2H), 3,81 (s, 3H). Infravermelho: ν<sub>máx</sub> 3443 cm<sup>-1</sup>, 3165 cm<sup>-1</sup>, 1070,49 cm<sup>-1</sup>, 923,9cm<sup>-1</sup>.

#### 5.5.2.3.4. Composto 33d: 5-Fenilo-6-metoxi-8-aminoquinolinas

O composto **33d** foi obtido como um sólido castanho alaranjado com um rendimento de 63%.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,60 (dd, *J* = 4,1, 1,4 Hz, 1H), 7,87 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,48 (dd, *J* = 15,4, 8,1 Hz, 2H), 7,38 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,33 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H), 7,26 – 7,22 (m, 1H), 6,82 (s, 1H), 5,20 (s, 2H), 3,81 (s, 3H). Infravermelho: ν<sub>máx</sub> 3441 cm<sup>-1</sup>, 3364cm<sup>-1</sup>, 1355,96 cm<sup>-1</sup>.

#### 5.5.2.4. Composto 34: Tetraoxano ácido

A uma solução do tetraoxano éster, composto **34**, (650 mg; 1,84 mmol) numa mistura MeOH:H<sub>2</sub>O (3:1; 6,05ml) sob agitação a 80 °C adicionou-se uma solução de NaOH 10M (930 µl; 9,2 mmol). A formação do produto foi monitorizada por cromatografia em camada fina e cerca de 1h após o início da reacção a mistura reaccional foi diluída com H<sub>2</sub>O e extraída com éter. De seguida, a fase aquosa foi acidificada até pH 2 com HCl 1M e extraída com éter. As fases orgânicas foram lavadas com uma solução saturada de cloreto de sódio, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida. O composto 31 foi obtido como um sólido branco com um rendimento de 90%. Ponto de fusão: 182 °C – 186 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,17 (s, 1H), 2,94 (s, 1H), 2,49 (s, 1H), 2,03 – 1,61 (m, 24H). Infravermelho: ν<sub>máx</sub> 2908 cm<sup>-1</sup>, 1697 cm<sup>-1</sup>, 1446 cm<sup>-1</sup>, 1217cm<sup>-1</sup>, 1060 cm<sup>-1</sup>, 997 cm<sup>-1</sup>.

#### 5.5.2.5. Compostos 35a – d: compostos híbridos tetraoxano-5-arilo-6-metoxi-8-aminoquinolina com *linker* amida

##### Método A

A uma solução do composto **34** (66 mg; 0,2 mmol) em diclorometano anidro (6,4 ml) em agitação a 0 °C, sob atmosfera de N<sub>2</sub> adicionou-se trietilamina (42 µl; 0,3 mmol) e TBTU (65 mg; 0,2 mmol). Cerca de 60 minutos depois juntou-se à reacção os compostos **33** (0,2 mmol) e a mistura reaccional foi aquecida até à temperatura ambiente. Cerca de 16 h depois fez-se uma nova recarga de TBTU (32 mg; 0,1 mmol) e trietilamina (28 µl; 0,2 mmol). A formação de produto foi monitorizada por cromatografia em camada fina e ao fim de 19 h a mistura reaccional foi diluída com água e extraída com diclorometano. As fases orgânicas foram lavadas com uma solução saturada de cloreto de sódio, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida. Contudo, após purificação por cromatografia em coluna com sílica (5:95 acetato de etilo/ *n*-hexano) não se obtiveram os compostos pretendidos.

##### Método B

A uma solução do composto **34** (80 mg; 0,25 mmol) em diclorometano anidro (5,62ml) em agitação à temperatura ambiente, sob atmosfera de N<sub>2</sub>, adicionou-se cloroformato de etilo (27 µl; 0,28 mmol) e trietilamina destilada (53 µl; 0,38 mmol). A formação do produto foi monitorizada por cromatografia em camada fina e cerca de 60 minutos depois juntou-se à reacção os compostos **33** (0,25 mmol) e a mistura reaccional foi sujeita a aquecimento a 60 °C. Mais uma vez a formação do produto foi monitorizada por cromatografia em camada fina e

aproximadamente 7 h depois adicionou-se ao balão reaccional uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e fizeram-se extracções com diclorometano. As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida. Os compostos **32** foram obtidos após purificação por cromatografia em coluna com sílica (7:93 acetato de etilo/ *n*-hexano).

**5.5.2.5.1. Composto 35a: híbrido tetraoxano-5-fluorfenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina com linker amida**

O composto **35a** foi obtido como um sólido branco-amarelado com um rendimento de 52%. Ponto de fusão: 204-206°C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,09 (s, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,64 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 7,85 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7,34 – 7,27 (m, 3H), 7,17 (t,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,21 (s, 2H), 2,63 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 2,20 – 1,61 (m, 24H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,70 (s), 163,64 (s), 161,20 (s), 154,85 (s), 1485,82 (s), 145,82 (s), 135,46 (s), 133,69 (s), 133,03 (s), 130,93 (s), 128,56 (s), 122,45 (s), 117,65 (s), 115,56 (s), 110,73 (s), 107,28 (s), 56,82 (s), 45,65 (s), 37,08 (s), 33,39 (s), 30,21 (s), 27,28 (s).

MS alta resolução (IE)  $m/z = 575,26$  [M+H]. Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  1678,07  $\text{cm}^{-1}$ , 1458,18  $\text{cm}^{-1}$ , 1058,92  $\text{cm}^{-1}$ , 995,27  $\text{cm}^{-1}$ .

**5.5.2.5.2. Composto 35b: híbrido tetraoxano-5-clorofenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina com linker amida**

O composto **35b** foi obtido como um sólido branco-amarelado com um rendimento de 51%. Ponto de fusão: 208-210°C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,09 (s, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,64 (d,  $J = 3,0$  Hz, 1H), 7,86 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,46 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,32 (dd,  $J = 8,6, 4,1$  Hz, 1H), 7,27 (d,  $J = 7,6$  Hz, 3H), 3,91 (s, 3H), 3,20 (s, 1H), 2,63 (t,  $J = 10,9$  Hz, 1H), 2,23 – 1,54 (m, 26H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,60 (s), 154,60 (s), 145,80 (s), 135,63 (s), 133,59 (s), 133,38 (s), 132,79 (s), 128,69 (s), 127,99 (s), 122,24 (s), 117,30 (s), 110,73 (s), 107,23 (s), 104,47 (s), 56,67 (s), 45,49 (s), 37,08 (s), 33,30 (s), 29,85 (s), 27,20 (s).

MS alta resolução (IE)  $m/z = 591,23$  [M+H]. Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  1685,79  $\text{cm}^{-1}$ , 1458,18  $\text{cm}^{-1}$ , 1172,32  $\text{cm}^{-1}$ , 997,2  $\text{cm}^{-1}$ .



**5.5.2.5.3. Composto 35c: híbrido tetraoxano-5-bromofenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina com *linker* amida**

O composto **35c** foi obtido como um sólido branco-amarelado com um rendimento de 52%.  
 Ponto de fusão: 212-214°C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,09 (s, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,64 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H), 7,86 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,61 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,32 (dd,  $J = 8,6, 4,1$  Hz, 1H), 7,21 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,20 (s, 1H), 2,63 (t,  $J = 10,9$  Hz, 1H), 2,17 – 1,56 (m, 28H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,62 (s), 154,42 (s), 145,82 (s), 135,53 (s), 134,09 (s), 133,14 (s), 131,64 (s), 128,00 (s), 122,26 (s), 121,59, 117,18 (s), 110,73 (s), 107,22 (s), 104,44 (s), 56,66 (s), 45,49 (s), 37,07 (s), 33,29 (s), 29,85 (s), 27,19 (s), 19,01 (s).

MS alta resolução (IE)  $m/z = 637,17$   $[\text{M}+\text{H}]$ . Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  1685,79  $\text{cm}^{-1}$ , 1458,18  $\text{cm}^{-1}$ , 1170,79  $\text{cm}^{-1}$ , 997,2  $\text{cm}^{-1}$ .

**5.5.2.5.4. Composto 35d: híbrido tetraoxano-5-fenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina com *linker* amida**

O composto **35d** foi obtido como um sólido branco-amarelado com um rendimento de 58%.  
 Ponto de fusão: 184-186°C.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,10 (s, 1H), 8,85 (s, 1H), 8,64 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H), 7,89 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 7,49 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 7,41 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 7,33 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 7,31 – 7,28 (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,20 (s, 2H), 2,64 (t,  $J = 10,7$  Hz, 1H), 2,25 – 1,55 (m, 25H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,89 (s), 154,74 (s), 146,02 (s), 135,50 (s), 131,68 (s), 128,71 (s), 127,72 (s), 122,35 (s), 119,13 (s), 111,03 (s), 107,57 (s), 57,04 (s), 45,79 (s), 37,39 (s), 33,61 (s), 27,49 (s).

MS alta resolução (IE)  $m/z = 557,27$   $[\text{M}+\text{H}]$ . Infravermelho:  $\nu_{\text{máx}}$  1676,14  $\text{cm}^{-1}$ , 1384,89  $\text{cm}^{-1}$ , 1132,21  $\text{cm}^{-1}$ , 997,20  $\text{cm}^{-1}$ .

**5.5.2.6. Composto 36: Tetraoxano hidroxamato**

A uma solução do tetraoxano ácido, composto **34**, (500 mg; 1,54mmol) em diclorometano anidro (7,2 ml) em agitação à temperatura ambiente, sob atmosfera de  $\text{N}_2$ , adicionou-se clorofornato de etilo (162  $\mu\text{l}$ ; 1,7 mmol) e trietilamina (643  $\mu\text{l}$ ; 4,62 mmol). A formação do produto foi monitorizada por cromatografia em cama da fina e passados cerca de 60 minutos, juntou-se à mistura reaccional N,O-dimetilhidroxilamina (165 mg; 1,7 mmol). A formação do produto foi monitorizada por cromatografia em camada fina e passadas cerca de 16 h adicionou-se ao meio reaccional uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio

fazendo-se, posteriormente, extracções com diclorometano. As fases orgânicas foram secas e concentradas a pressão reduzida.

Após purificação por cromatografia em coluna com sílica (20:80 acetato de etilo/ *n*-hexano) o produto foi obtido como um óleo amarelado com um rendimento de 87%.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,70 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 2,75 (s, 1H), 2,07 – 1,46 (m, 23H).

#### 5.5.2.7. Composto 37: Tetraoxano aldeído

A uma solução do tetraoxano hidroxamato, composto **36** (470 mg; 1,28 mmol) em THF seco (19,6 ml) em agitação a 0 °C, sob atmosfera de  $\text{N}_2$ , adicionou-se hidreto de alumínio-lítio (65 mg; 1,7 mmol). O consumo do material de partida foi monitorizado por cromatografia em camada fina e ao fim de 2 h juntou-se à mistura reaccional 2 ml de uma solução de bissulfito de potássio 0,7 M. De seguida mistura reaccional foi diluída com água e extraída com éter. As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com uma solução saturada de cloreto de sódio e uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida. O produto foi obtido como uma espuma amarelada com um rendimento de 97%.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,65 (s, 1H), 3,74 (s, 2H), 3,15 (s, 1H), 2,81 (s, 1H), 2,35 (s, 1H), 2,01 – 1,49 (m, 28H).

#### 5.5.2.8. Composto 38: híbrido tetraoxano-5-fenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina com *linker* amina

##### Método A

A uma solução do tetraoxano aldeído, composto **37**, (25 mg, 0,081 mmol) em diclorometano anidro (1 ml) adicionou-se o composto **33c** (0,09 mmol) e deixou-se a mistura em agitação a 60°C sob atmosfera de  $\text{N}_2$ . A evolução da mistura reaccional foi monitorizada por cromatografia em camada fina e ao fim de cerca de 60 minutos adicionou-se à mistura reaccional ácido acético (7  $\mu\text{l}$ , 0,12 mmol) e triacetoxiborohidreto de sódio (26 mg, 0,12 mmol). A formação de produto foi mais uma vez seguida por cromatografia em camada fina e a reacção foi parada ao fim de aproximadamente 9h com a adição de uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio à mistura reaccional. Fizeram-se extracções com acetato de etilo e as fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio de anidro e concentradas a pressão reduzida. A purificação da mistura reaccional foi feita por cromatografia em camada

fina preparativa, usando como eluente 100% de acetato de etilo, contudo não foi possível obter o produto pretendido.

### **Método B**

A uma solução do híbrido tetraoxano-5-fenilo-6-metoxi-8-aminoquinolina, composto **35d** (25 mg; 0,045 mmol) em THF (1 ml), em agitação a 0 °C, sob atmosfera de N<sub>2</sub>, adicionou-se hidreto de alumínio-lítio (2 mg; 0,054 mmol). A mistura reaccional foi aquecida até à temperatura ambiente e ao fim de 3 h fez-se uma recarga de hidreto de alumínio-lítio (6 mg; 0,162 mmol). A formação de produto foi monitorizada por cromatografia em camada fina e ao fim de 6 h parou-se a reacção com a adição de 2 ml de uma solução 0,7 M de bissulfito de potássio. A mistura reaccional foi diluída com água e extraída com acetato de etilo e as fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida. A purificação da mistura reaccional foi feita por cromatografia em camada fina preparativa, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e *n*-hexano nas proporções 30:70. O produto foi obtido como um sólido amarelo com um rendimento de 16%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,61 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 7,93 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,47 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,39 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,32 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 6,84 (s, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,50 (d, *J* = 4,2 Hz, 2H), 3,15 (s, 1H), 2,04 – 1,43 (m, 27H).

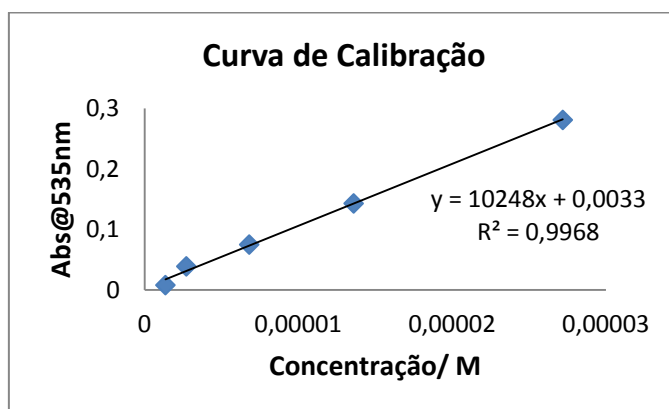
### **5.6 Determinação da actividade do enzima CYP2E1 nos microssomas de fígado de rato**

A actividade dos microssomas usados nos testes de estabilidade dos compostos híbridos tetraoxano-5-arilo-6-metoxi-8-aminoquinolina com um *linker* amida, compostos **35**, foi determinada pela quantificação da actividade do enzima CYP2E1, através do estudo da conversão enzimática do *p*-nitrofenol a *p*-nitrocatecol.

Para estudar a conversão *p*-nitrofenol a *p*-nitrocatecol pipetaram-se para um tubo de ensaio 1320 µl de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,4, 30 µl de uma solução 5 mM de *p*-nitrofenol no tampão do ensaio, 75 µl da solução A (26 mM NADP<sup>+</sup>; 66 mM 6-fosfato-D-glucose; 66 mM de cloreto de magnésio) e 15 µl da solução B (6-fosfato de glucose desidrogenase (40 U/ml) em 5mM de citrato de sódio). A mistura reaccional foi incubada a 37 °C por 5 min num banho de água e a reacção foi iniciada com a adição de 60 µl de microssomas. Passados 30 minutos a 37 °C adicionaram-se 300 µl de TFA 20% e colocou-se o tubo em gelo. A mistura reaccional foi centrifugada a 10000g por 5 min e 1,5 ml do sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio com 0,75 ml de NaOH 20%. O tubo foi

homogeneizado no vórtex e a absorvência lida a 535 nm. Para fazer um branco procedeu-se da mesma forma mas os microssomas activos foram substituídos por microssomas inactivados pelo calor.

Para converter a absorvência da amostra na concentração de *p*-nitrocatecol foi necessário traçar uma curva de calibração com concentrações conhecidas de *p*-nitrocatecol. Com esse fim, prepararam-se 5 soluções de *p*-nitrocatecol (1 nmol, 2nmol, 5nmol, 10nmol e 20 nmol) em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,4. De seguida, mediu-se a absorvência de cada uma delas a 535 nm e traçou-se o gráfico apresentado na **Figura 64**.



**Figura 124**– Curva de Calibração usada para determinar a actividade do enzima CYP2E1

Pela equação da recta ( $Y=10248x + 0,0033$ ) e atendendo ao tempo de incubação, volume do ensaio (750  $\mu$ l) e quantidade de proteína calculou-se a actividade do enzima CYP2E1 de acordo com a **Equação 2**.

$$Actividade = \frac{\left( \frac{Abs@535 - 0,0033}{10248} \right) / volume\ ensaio}{tempo \times quantidade\ de\ prote\acute{ina}} \quad \text{Equação 2}$$

O valor obtido, 1163,64 pmol/min mg, está de acordo com o indicado pelo fornecedor pelo que se pode concluir que os microssomas não apresentam perdas de actividade.

### **5.7 Determinação da estabilidade metabólica dos compostos 35 – híbridos tetraoxano-5-arilo-6-metoxi-8-aminoquinolina com um *linker* amida**

Para determinar o tempo de meia-vida dos compostos **35** preparou-se uma solução mãe com a concentração de 10 mM de cada em DMSO ou acetonitrilo conforme a solubilidade dos compostos.

De seguida, traçaram-se espectros UV-vísivel dos compostos com vista a determinar o comprimento de onda de máxima absorção. Posteriormente procedeu-se à escolha do sistema de eluentes que permitiam que os compostos tivessem um tempo de retenção adequado para fazer os estudos.

Para o estudo de estabilidade metabólica dos compostos pipetaram-se para um *eppendorf* 20 µl de microssomas, 570 µl de água, 160 µl de tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 7,4 e 8 µl da solução 10 mM do composto em estudo. A mistura reaccional foi homogeneizada e depois incubada num banho de água a 37 °C por 5 min. O início da reacção deu-se com a adição dos cofactores: 40 µl da solução A (26 mM NADP<sup>+</sup>; 66 mM 6-fosfato-D-glucose; 66 mM de cloreto de magnésio) e 8 µl da solução B (6-fosfato de glucose desidrogenase (40 U/ml) em 5mM de citrato de sódio).

Recolheram-se alíquotas com um volume de 60 µl da mistura reaccional para *eppendorfs*, a tempos determinados. No caso do composto **35d** a reacção foi parada pela adição de 60 µl de acetonitrilo frio à alíquota retirada, já no caso dos compostos **35a – c** parou-se a reacção com a adição de uma mistura fria de 12,5 µl de DMSO e 47,5 µl de acetonitrilo à alíquota.

Após adição do solvente orgânico os *eppendorfs* foram homogeneizados no vórtex e centrifugados a 10000 rpm por um período de 5 minutos. O sobrenadante foi analisado por HPLC (injecção de 20 µl). Os ensaios foram efectuados em triplicado.

### **5.8 Determinação da actividade e toxicidade dos compostos 35 na fase hepática da malária**

A capacidade inibitória da infecção das células hepáticas pelos compostos **35** foi testada num modelo *in vitro* da malária que se baseia no uso de células de hepatoma humanas (Huh 7) e do parasita *P. berghei* (roedor). As células de hepatoma humanas foram incubadas com os compostos em teste, DMSO (controlo negativo) e primaquina (controlo positivo), nas concentrações de 2 µM e 10 µM. Cerca de 1 h depois as mesmas foram infectadas com esporozoítos de *P.berghei* que expressam a luciferase, obtidos pela dissecação das glândulas salivares de mosquitos *Anopheles* fêmea infectados. Passadas 46 h do início da infecção, a confluência celular foi medida pelo ensaio do *alarmarBlue*. Este ensaio baseia-se na

capacidade do *AlamarBlue* mudar a sua cor e fluorescência em resposta às condições redutoras do meio de cultura, fruto do crescimento celular. As células foram incubadas 1h 30min com meio de cultura que continha 5% de *AlamarBlue* e a sua fluorescência foi medida. Para determinar a carga parasitária as células incubadas com as diferentes concentrações de composto foram lavadas com PBS e lisadas com o reagente de lise para células em cultura do kit do sistema de ensaios da Promega (25 mM tampão tris-fosfato pH 7,8; 2 mM DTT; 2 mM 1,2-diaminociclohexano-ácido-N,N,N,N- tetraacético; 10% glicerol; 1% triton X-100; 1,25 mg/ml lisozima; 2,5 mg/ ml BSA; água). Posteriormente transferiram-se 35 µl do lisado celular para uma placa de 96 poços, adicionaram-se 50 µl do substrato do ensaio da luciferase e mediu-se a fluorescência dos poços. Os ensaios foram efectuados em triplicado.

# Capítulo 6

## **Bibliografía**

- [1] Carter, R., Mendis, K. (2002). Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 564-594.
- [2] Baird, J. (2012). Chemotherapeutics challenges in developing effective treatments for the endemic malarias. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 256-261.
- [3] Burrows, J. N., van Huijsduijnen, R. H., Möhrle, J. J., Oeuvray, C., & Wells, T. N. C. (2013). Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. *Malaria journal*, 12, 187.
- [4] Burrows, J. N., Burlot, E., Campo, B., Cherbuin, S., Jeanneret, S., Leroy, D., Spangenberg, T., Waterson, D., Wells, T., Willis, P. (2013). Antimalarial drug discovery - the path towards eradication. *Parasitology*, 1-12.
- [5] Aguiar, A. C. C., Rocha, E. M. M. Da, Souza, N. B. De, França, T. C. C., & Krettli, A. U. (2012). New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(7), 831-45.
- [6] Shio, M. T., Kassa, F. a, Bellemare, M.-J., & Olivier, M. (2010). Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 12(12-13), 889-99.
- [7] WHO, World malaria report 2011. (2011).
- [8] <http://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>
- [9] Navarro, M., Castro, W., & Biot, C. (2012). Bioorganometallic Compounds with Antimalarial Targets: Inhibiting Hemozoin Formation. *Organometallics*, 31(16), 5715-5727.
- [10] Kumar, N., Singh, R., & Rawat, D. S. (2010). Tetraoxanes : Synthetic and Medicinal Chemistry Perspective. *Medicinal Research Reviews*, 32(3), 581-610.
- [11] Kaur, K., Jain, M., Reddy, R. P., & Jain, R. (2010). Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *European journal of medicinal chemistry*, 45(8), 3245-64.
- [12] Lover, A. a, & Coker, R. J. (2013). Quantifying effect of geographic location on epidemiology of Plasmodium vivax malaria. *Emerging infectious diseases*, 19(7), 1058-65.
- [13] Opsenica, D., Solaja, B. (2009). Antimalarial peroxides. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(11), 1155-1193.
- [14] Tilley, L., Dixon, M. W. a, & Kirk, K. (2011). The Plasmodium falciparum-infected red blood cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(6), 839-42.
- [15] Klonis, N., Dilanian, R., Hanssen, E., Darmanin, C., Streltsov, V., Deed, S., Tilley, L. *et al* (2010). Hematin-hematin self-association states involved in the formation and reactivity of the malaria parasite pigment, hemozoin. *Biochemistry*, 49(31), 6804-11.



- [16] MacRae, J. I., Dixon, M. W., Dearnley, M. K., Chua, H. H., Chambers, J. M., Kenny, S., McConville, M. J. (2013). Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC biology*, 11(1), 67.
- [17] Jayaraman, V., Bulusu, V., & Balaram, H. (2012). Crosstalk between purine nucleotide metabolism and mitochondrial pathways in *Plasmodium falciparum*. *Current Science*, 102(5), 757-765.
- [18] Nixon, G. L., Pidathala, C., Shone, A. E., Antoine, T., Fisher, N., O'Neill, P. M., Biagini, G. a. (2013). Targeting the mitochondrial electron transport chain of *Plasmodium falciparum*: new strategies towards the development of improved antimalarials for the elimination era. *Future medicinal chemistry*, 5(13), 1573–91.
- [19] Biagini, G. A., Fisher, N., Shone, A. E., Mubarak, M. A., Srivastava, A., & Hill, A. (2012). Generation of quinolone antimalarials targeting the *Plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (21), 8298-8303.
- [20] Khanna, N. (2007). Antimicrobial Agents: Antiprotozoal Drugs. *University College of Medical Sciences Shahdara, Delhi*.
- [21] Fraisse, L., Pellet, A., Mordmu, B., & Kremsner, P. G. (2008). Selection of a trioxaquine as an antimalarial. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(45).
- [22] Borstnik, K., Paik, I., Shapiro, T. a, & Posner, G. H. (2002). Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. *International journal for parasitology*, 32(13), 1661–7.
- [23] Dong, Y., McCullough, K., Wittlin, S., Chollet, J., Vennerstrom, J. (2010). The structure and antimalarial activity of dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes derived from (+)-dihydrocarvone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 6359-6361.
- [24] Muregi, F., Ishih, A. (2010). Next-Generation Antimalarial Drugs: Hybrid Molecules as a New Strategy in Drug Design. *Drug Development Research*, 71, 20-32.
- [25] Copple, I. M., Mercer, A. E., Firman, J., Donegan, G., Herpers, B., Wong, M. H., Park, B. K. *et al* (2012). Examination of the cytotoxic and embryotoxic potential and underlying mechanisms of next-generation synthetic trioxolane and tetraoxane antimalarials. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 18, 1045–55.
- [26] Wang, X., Dong, Y., Wittlin, S., Charman, S. A., Chiu, F. C. K., Chollet, J., Katneni, K., Mannila, J., Morizzi, J., Ryan, E., Scheurer, C., Steuten, J., Tomas, J, Snyder, C. and Vennerstrom, J. L. (2013). Comparative antimalarial activity and ADME profiles of ozonides (1,2,4-trioxolanes) OZ277, OZ439 and Their 1,2-Dioxolane, 1,2,4-Trioxane and 1,2,4,5-Tetraoxane isosteres. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(6):2547-55.
- [27] Ghorai, P., & Dussault, P. H. (2008). Mild and Efficient Re(VII)-Catalyzed Synthesis of 1,1-Dihydroperoxides. *Organic letters*, 10(20), 4577-4579.

- [28] Creek, D., Charman, W., Chiu, F., Prankerd, R., Dong, Y., Vennerstrom, J., Charman, A. (2008). Relationship between Antimalarial Activity and Heme Alkylation for Spiro- and Dispiro-1,2,4-Trioxolane Antimalarials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1291-1296.
- [29] Ghorai, P., & Dussault, P. H. (2009). Broadly applicable synthesis of 1,2,4,5-tetraoxanes. *Organic letters*, 11(1), 213–6.
- [30] Bousejra-El Garah, F., Wong, M. H.-L., Amewu, R. K., Muangnoicharoen, S., Maggs, J. L., Stigliani, J.-L., O'Neill, P. M. *et al* (2011). Comparison of the reactivity of antimalarial 1,2,4,5-tetraoxanes with 1,2,4-trioxolanes in the presence of ferrous iron salts, heme, and ferrous iron salts/phosphatidylcholine. *Journal of medicinal chemistry*, 54(19), 6443–55.
- [31] Opsenica, I., Terzić, N., Opsenica, D., Angelovski, G., Lehnig, M. *et al* (2006). Tetraoxane Antimalarials and Their Reaction with Fe(II). *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 3790-3799.
- [32] McChesney, J. (1981). Considerations about the structure-activity relationships of 8-aminoquinolines antimalarials drugs. *Bulletin of the World Health Organization*, 59(3), 459-462.
- [33] Krafts, K., Hempelmann, E., & Skórska-Stania, A. (2012). From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitology research*, 111(1), 1–6.
- [34] Vale, N., Moreira, R., & Gomes, P. (2009). Primaquine revisited six decades after its discovery. *European journal of medicinal chemistry*, 44(3), 937–53.
- [35] Myint, H. Y., Berman, J., Walker, L., Pybus, B., Melendez, V., Baird, J. K., & Ohrt, C. (2011). Review: Improving the therapeutic index of 8-aminoquinolines by the use of drug combinations: review of the literature and proposal for future investigations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(6), 1010–4.
- [36] Wilson, D., Langer, C., Goodman, C., McFadden, G., Beeson, J. (2013). Defining the time of action of Antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 57(3), 1455-1467.
- [37] Marcsisin, S. R., Jin, X., Bettger, T., McCulley, N., Sousa, J. C., Shanks, G. D., Tekwani, B., Sahu, R., Reichard, G., Sciotti, R., Melendez, V. and Pybus, B. S. (2013). CYP450 phenotyping and metabolite identification of quinine by accurate mass UPLC-MS analysis: a possible metabolic link to blackwater fever. *Malaria journal*, 12(1), 214.
- [38] Kaur, K., Jain, M., Khan, S., Jacob, M., Tekwani, B., Singh, S., Singh, P., Jain, R. (2011). Extended side chain analogues of 8-aminoquinolines: Synthesis and evaluation of antiprotozoal, antimicrobial,  $\beta$ -hematin inhibition and cytotoxic activities. *Medicinal Chemistry Communications*, 2, 300-307.
- [39] Bueno, J. M., Manzano, P., García, M. C., Chicharro, J., Puente, M., Lorenzo, M., Gargallo-Viola, D. (2011). Potent antimalarial 4-pyridones with improved physico-chemical properties. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(18), 5214–8.

- [40] Almela, M. J., Torres, P. A., Lozano, S., & Herreros, E. (2009). Characterization of the phospholipidogenic potential of 4(1H)-pyridone antimalarial derivatives. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 23(8), 1528–34.
- [41] Rodrigues, T., Moreira, R., Gut, J., Rosenthal, P. J., O'Neill, P. M., Biagini, G. a, Lopes, F., Santos, D.J.V.A, Guedes, R. C. (2011). Identification of new antimalarial leads by use of virtual screening against cytochrome bc<sub>1</sub>. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(21), 6302–8.
- [42] Nwaka, S., Riopel, L., Ubben, D., Craft, J. (2004). Medicines for Malaria Venture new developments in antimalarials. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2, 161-170.
- [43] Yeates, C. L., Batchelor, J. F., Capon, E. C., Cheesman, N. J., Fry, M., Hudson, A. T., León, M. L., *et al* (2008). Synthesis and structure-activity relationships of 4-pyridones as potential antimalarials. *Journal of medicinal chemistry*, 51(9), 2845–52.
- [44] Barton, V., Fisher, N., Biagini, G. a, Ward, S. a, & O'Neill, P. M. (2010). Inhibiting Plasmodium cytochrome bc<sub>1</sub>: a complex issue. *Current opinion in chemical biology*, 14(4), 440–6.
- [45] Idro, R., Marsh, K., John, C., Newton, C. (2011). Cerebral Malaria: Mechanisms of Brain Injury and Strategies for Improved Neuro-Cognitive Outcome. *Pediatric Research*.
- [46] White, N. J. (2008). The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria. *Malaria journal*, 7 Suppl 1, S8.
- [47] Gosling, R., Okell, L., Mosha, J., Chandramohan, D. (2011). The role of antimalarial treatment in the elimination of malaria. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1617-1623.
- [48] Pretorius, S., Breytenbach, W., Kock, C., Smith, P., N'Da, D. (2012). Synthesis, chacterization and antimalarial activity of quinoline-pyrimidine hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 269-277.
- [49] Richard Morphy, R., Rankovic, Z. (2005). Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *Journal of medicinal chemistry*, 48(21), 6523–6543.
- [50] Chadwick, J., Amewu, R. K., Marti, F., Garah, F. B.-E., Sharma, R., Berry, N. G., O'Neill, P. M. (2011). Antimalarial mannoxanes: hybrid antimalarial drugs with outstanding oral activity profiles and a potential dual mechanism of action. *ChemMedChem*, 6(8), 1357–61.
- [51] Walsh, J. J., Coughlan, D., Heneghan, N., Gaynor, C., & Bell, A. (2007). A novel artemisinin-quinine hybrid with potent antimalarial activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(13), 3599–602.
- [52] Kumar, N., Khan, S. I., Atheaya, H., Mamgain, R., & Rawat, D. S. (2011). Synthesis and in vitro antimalarial activity of tetraoxane-amine/amide conjugates. *European journal of medicinal chemistry*, 46(7), 2816–27.
- [53] Lombardo, C. M., Welsh, S. J., Strauss, S. J., Dale, A. G., Todd, A. K., Nanjunda, R., Neidle, S. *et al* (2012). A novel series of G-quadruplex ligands with selectivity for HIF-expressing osteosarcoma and renal cancer cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(18), 5984–8.

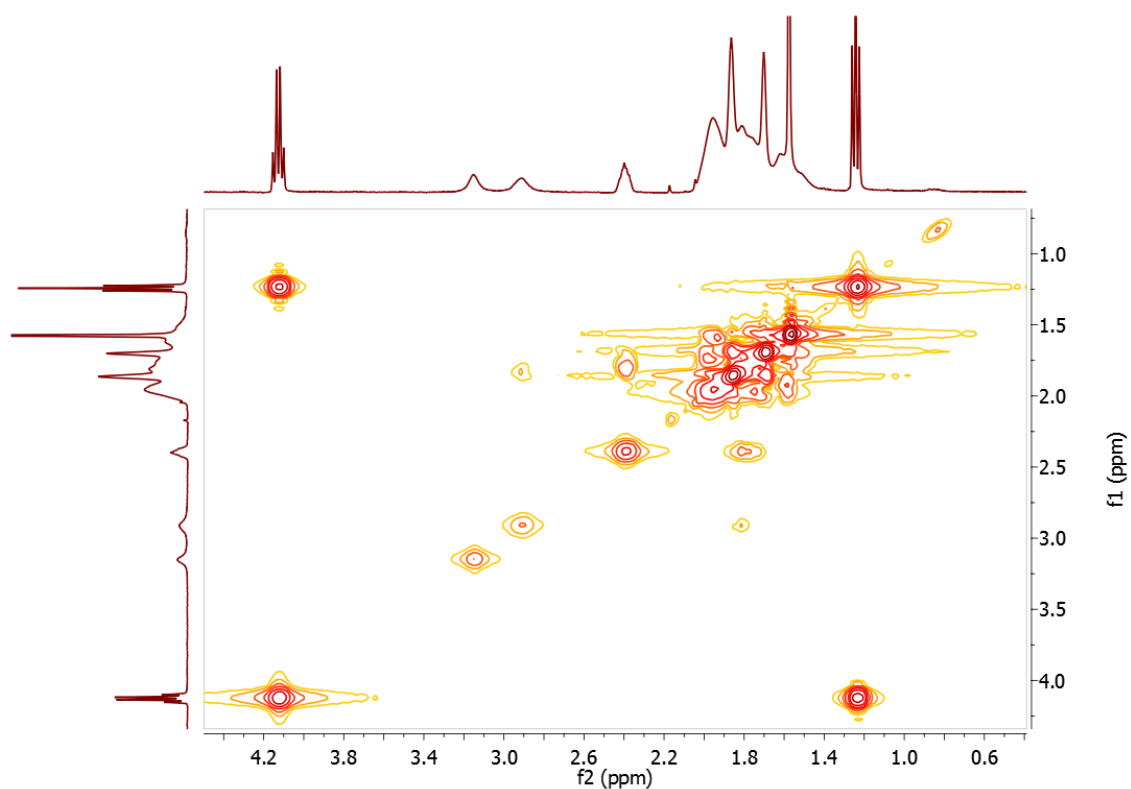
- [54] Shen, Q., Sloss, D., Berkowitz, D. (1994). Displacement of sugar triflates with C-nucleophiles: D-Glucopyranose and D-ribofuranose chain extension and functionalization. *Synthetic Communications*, 24(11), 1519-1530.
- [55] O'Neill, P. M., Amewu, R. K., Nixon, G. L., Elgarah, F. B., Mungthin, M., Chadwick, J., Ward, S. A *et al.* (2010). Candidate (RKA 182) with Superior Properties to the Semisynthetic Artemisinins, (Rka 182). *Angewandte chemie international edition*, 49(33):5693-7.
- [56] Opsenica, I., Opsenica, D., Smith, K. S., Milhous, W. K., & Solaja, B. a. (2008). Chemical stability of the peroxide bond enables diversified synthesis of potent tetraoxane antimalarials. *Journal of medicinal chemistry*, 51(7), 2261–6.
- [57] Silverstein, R. *et al* (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compunds*. Wiley, 7th Edition.
- [58] Vollhardt, P., Schore, N. (2010). *Organic Chemistry – Structure and Function*. WH Freeman, 6<sup>th</sup> Edition.
- [59] Guram, A.S., Buchwald, S.L. (1994). Palladium-Catalyzed Aromatic Aminations with in situ Generated Aminostannanes. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 7901-7902.
- [60] Navarro, O., Marion, N., Mei, J., & Nolan, S. P. (2006). Rapid room temperature Buchwald-Hartwig and Suzuki-Miyaura couplings of heteroaromatic compounds employing low catalyst loadings. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 12(19), 5142–8.
- [61] Chemica, D. P., Waghmare, A. A., Bose, P., & Pati, H. N. (2010). Direct nuclear halogenation of deactivated aryl and N –heteroaryl. *Der Pharma Chemica*, 2(5), 212–241.
- [62] Werble, E., Robert, B. Y., Field, E., Mitch, T., & Wempen, M. (1953). Synthesis of Primaquine and Certain of its Analogs. *Journal of the American Chemical Society*, 1, 2348(1926), 14–17.
- [63] Paul, F., Patt, J., Hartwig, J.F. (1994). Palladium-catalyzed formation of carbon-nitrogen bonds. Reaction intermediates and catalyst improvements in the hetero cross-coupling of aryl halides and tin amides. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 5969-5970.
- [64] Zhi-xiao, Y. U., Zhi-qiang, Z., Zhi-zhi, H. U., Peng, L. E. I., & Hai-jun, C. H. I. (n.d.). Highly Effective Palladium-Catalyzed Suzuki Cross- Coupling Reaction of 3- (Methylthio ) phenylboronic Acid with Aryl Bromide. *The Proceedings of the 3rd International Conference on Functional Molecules*, (Table 2), 1–4.
- [65] Miyaura, N., Suzuki, A. (1995). Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chemical Reviews*, (1), 2457–2483.
- [66] Shiraki, H., Kozar, M. P., Melendez, V., Hudson, T. H., Ohrt, C., Magill, A. J., & Lin, A. J. (2011). Antimalarial activity of novel 5-aryl-8-aminoquinoline derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, 54(1), 131–42.
- [67] Zhou, Y., Li, J., Liu, H., Zhao, L., & Jiang, H. (2006). An unusual de-nitro reduction of 2-substituted-4-nitroquinolines. *Tetrahedron Letters*, 47(48), 8511–8514.

- [68] Portela, M., Moreira, R., Valente, E., Constantino, L., Iley, J., Pinto, J., Rosa, R., Cravo, P., Rosário, V. (1999). Dipeptide Derivatives of Primaquine as Transmission-Blocking Antimalarials: Effects of aliphatic side-chain acylation on the Gametocytocidal activity and on the formation of Carboxiprimaquine in Rat liver Homogenates. *Pharmaceutical Research*, 16(6), 949-955.
- [69] Carey, F. (2000). Organic Chemistry. *McGraw-Hill*, 4<sup>th</sup> Edition, Chapter 19.
- [70] Valeur, E., & Bradley, M. (2009). Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society reviews*, 38(2), 606–631.
- [71] Abdel-magid, A. F., Carson, K. G., Harris, B. D., Maryanoff, C. a., & Shah, R. D. (1996). Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures(1). *The Journal of organic chemistry*, 8(11), 3849–3862.
- [72] Kim, M., Lee, H., Han, K.J., & Kay, K.-Y. (2003). An Efficient One-Pot Synthesis of N -Methoxy- N -methyamides from Carboxylic Acids. *Synthetic Communications*, 33(23), 4013–4018.
- [73] <http://scialert.net/fulltext/?doi=jbs.2008.1110.1114>
- [74] <http://www.springerprotocols.com/Abstract/doi/10.1385/1-59259-800-5:151>
- [75] <http://www.westernanalytical.com/pdf/app9.pdf>
- [76] Chang, T., Crespi, C., Waxman, D. (2006). Spectrophotometric Analysis of Human CYP2E1-Catalyzed p-Nitrophenol Hydroxylation. *Methods in Molecular Biology*, 320, 127-31.
- [77] Atkins, P., Paula, J. (2006). Physical Chemistry for the Life Sciences. W.H. Freeman.
- [78] Coteron, J.M. *et al* (2011). Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 5540–5561.

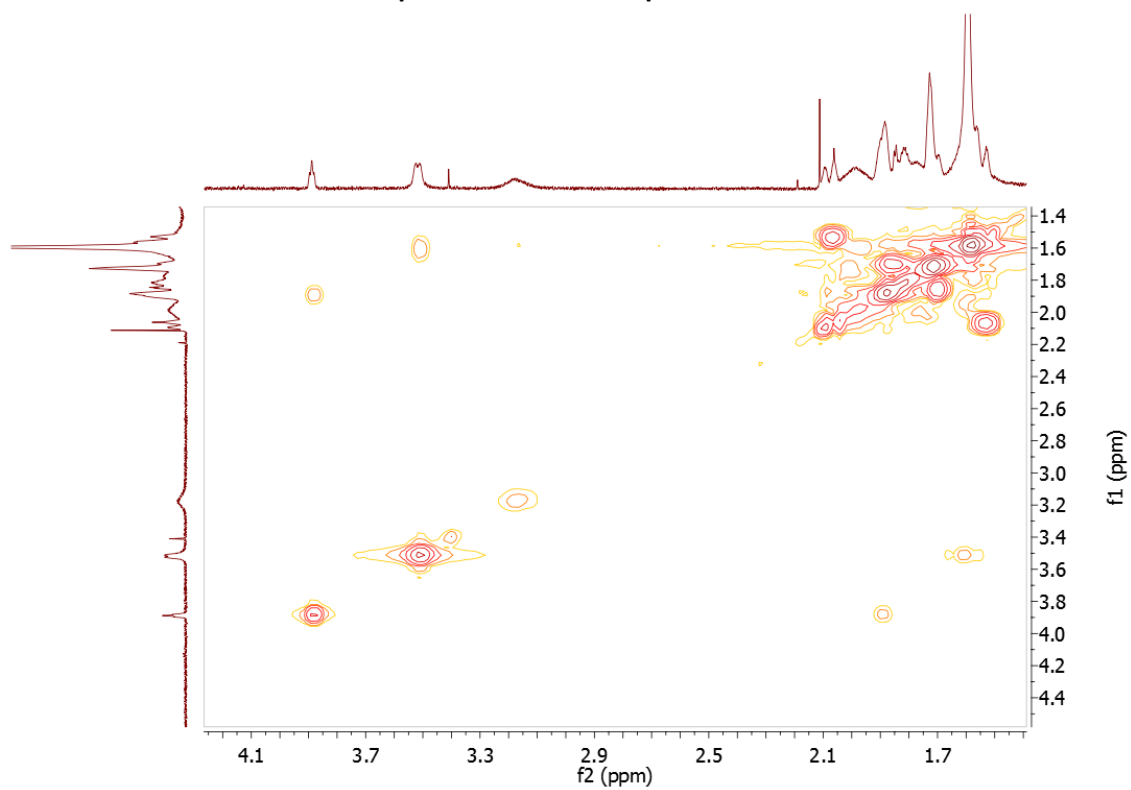
# Capítulo 7

## Anexos

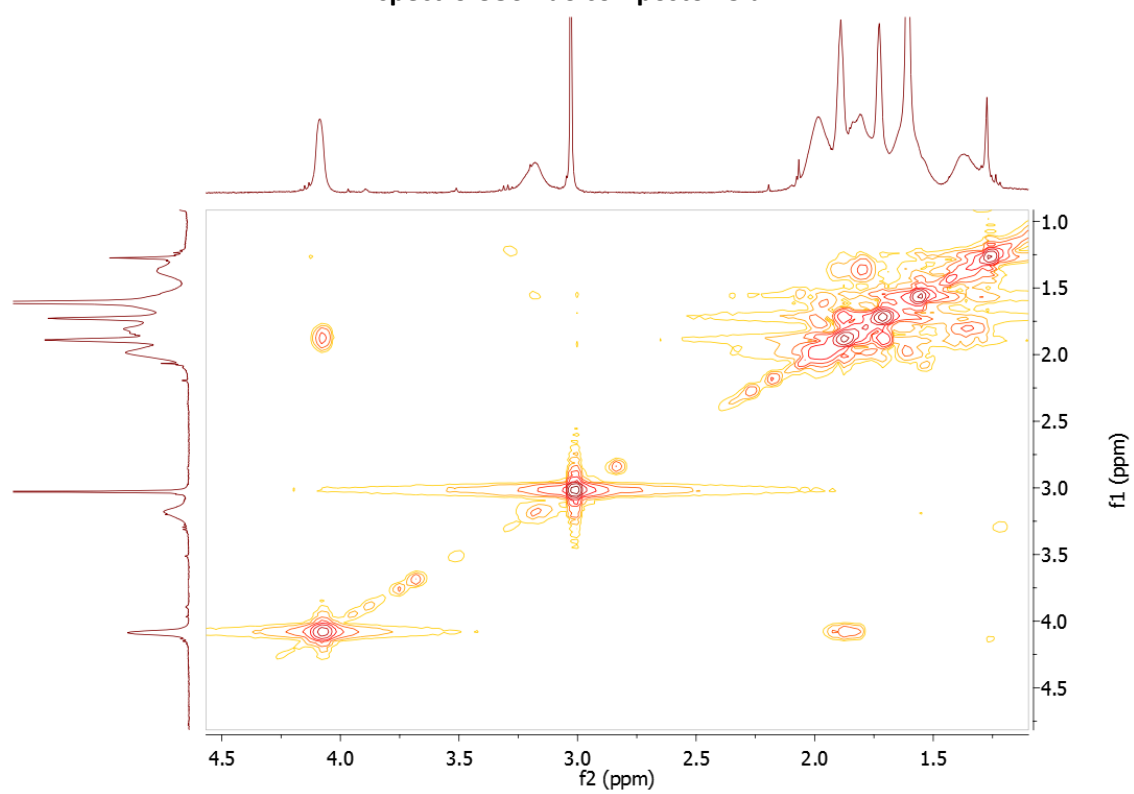
**Espectro COSY do composto 23.**



**Espectro COSY do composto 24.**

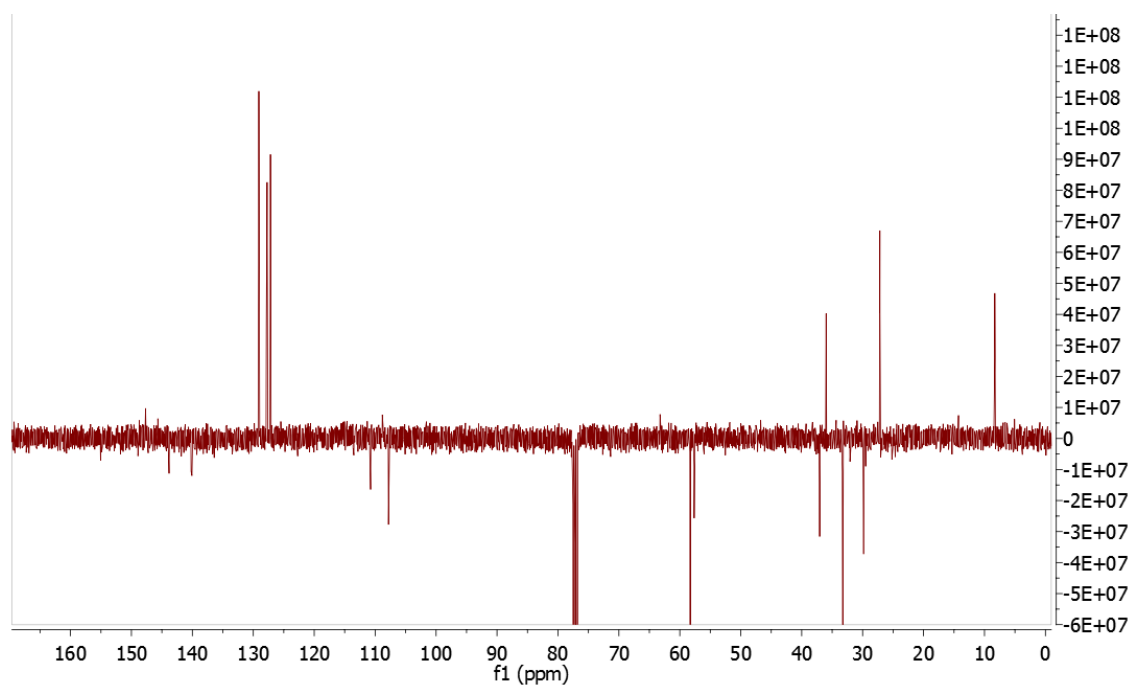


**Espectro COSY do composto 25 a.**

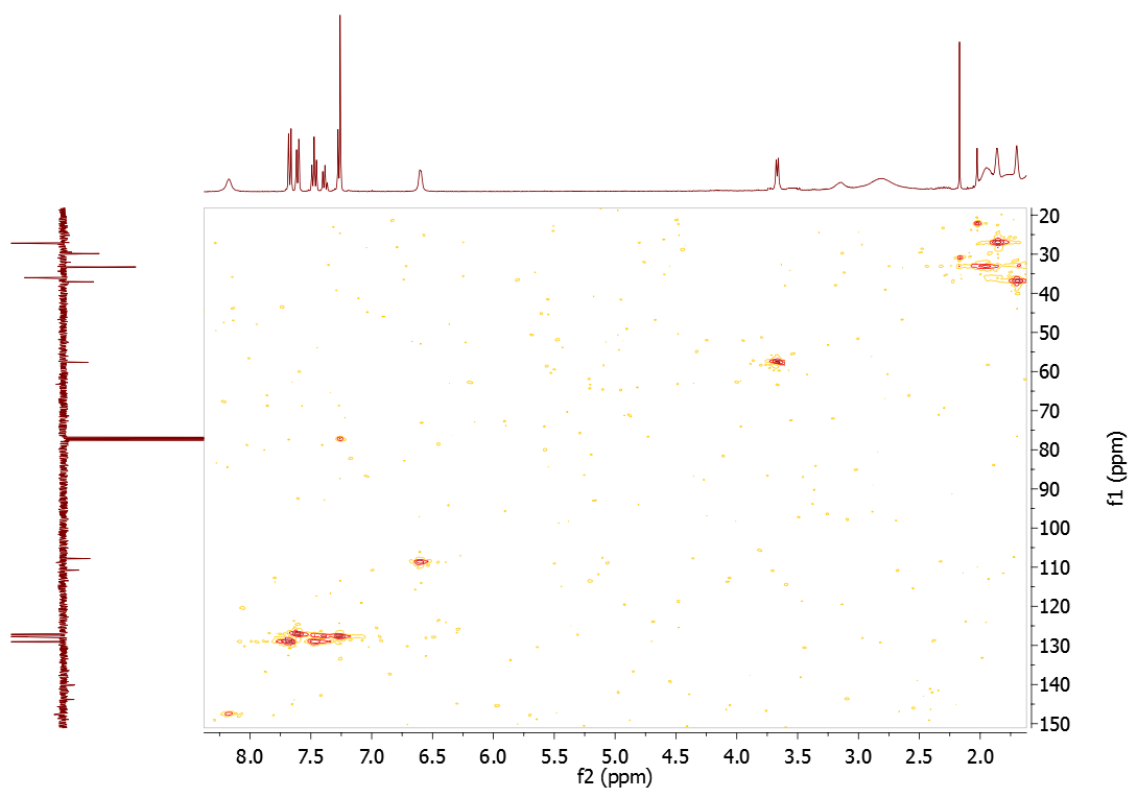




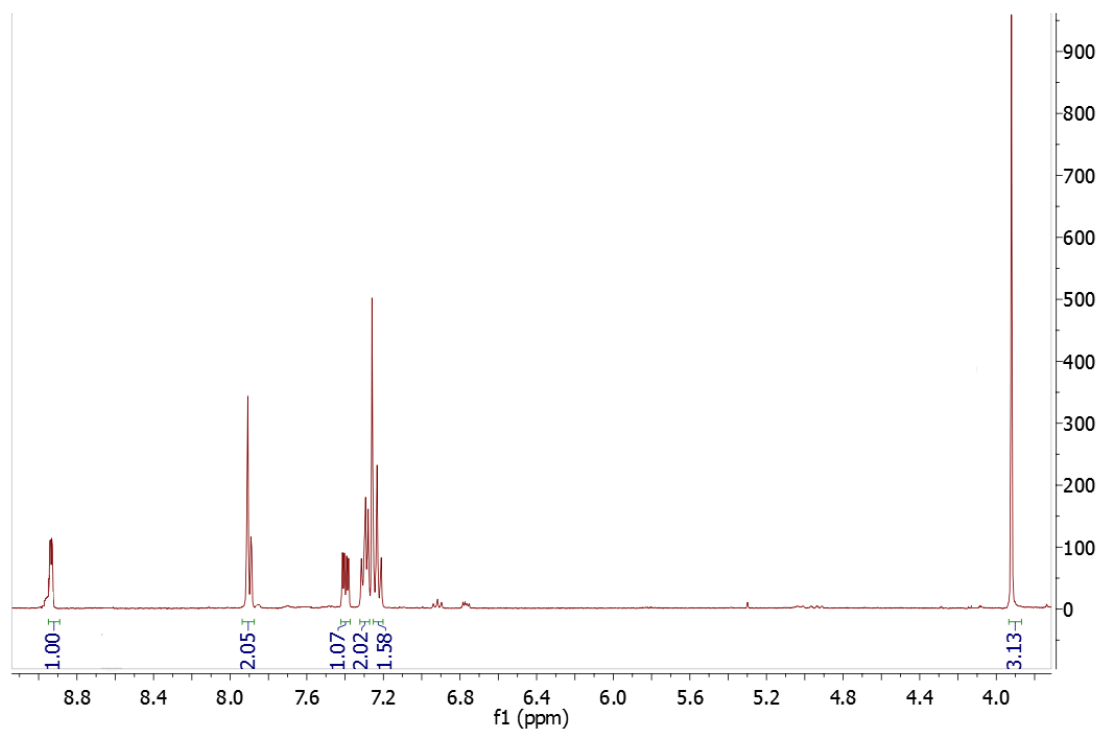
Espectro  $^{13}\text{C}$  do composto 29a.



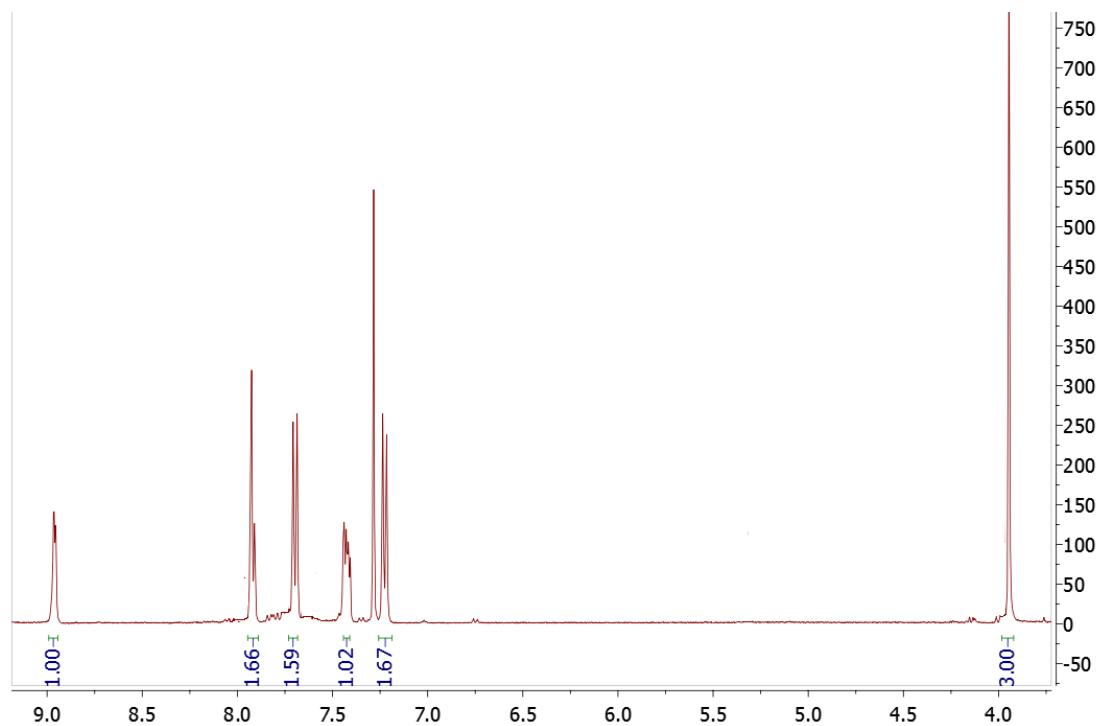
Espectro HMQC do composto 29a.



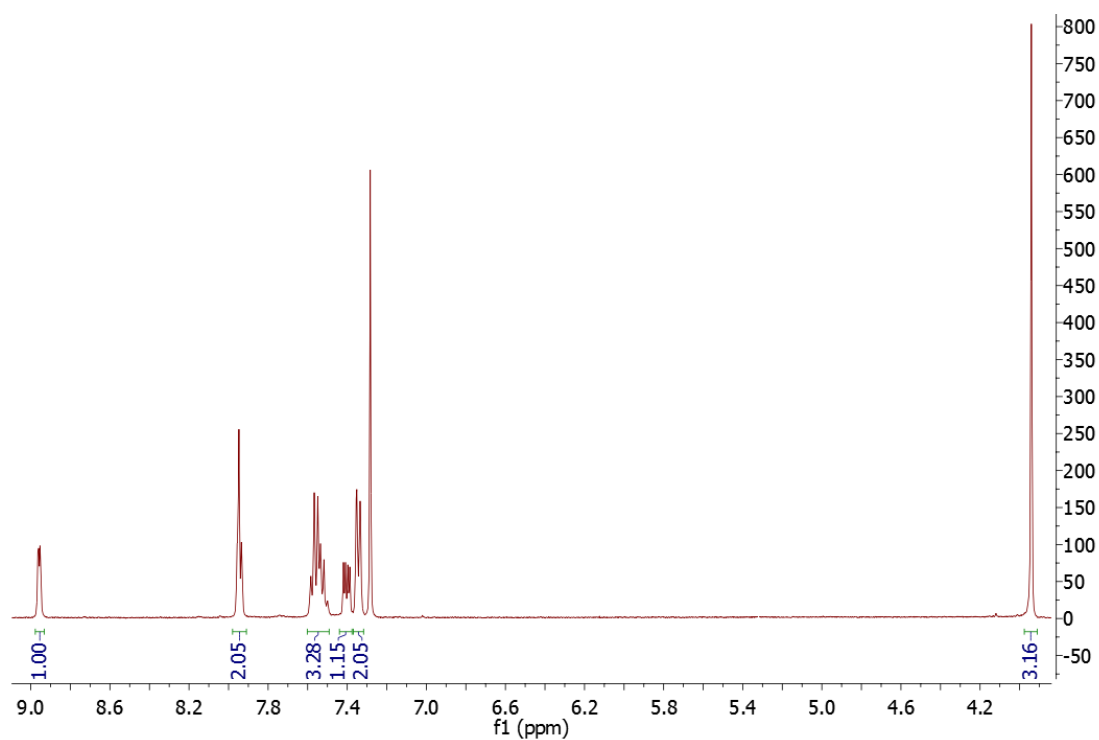
Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto 32a.



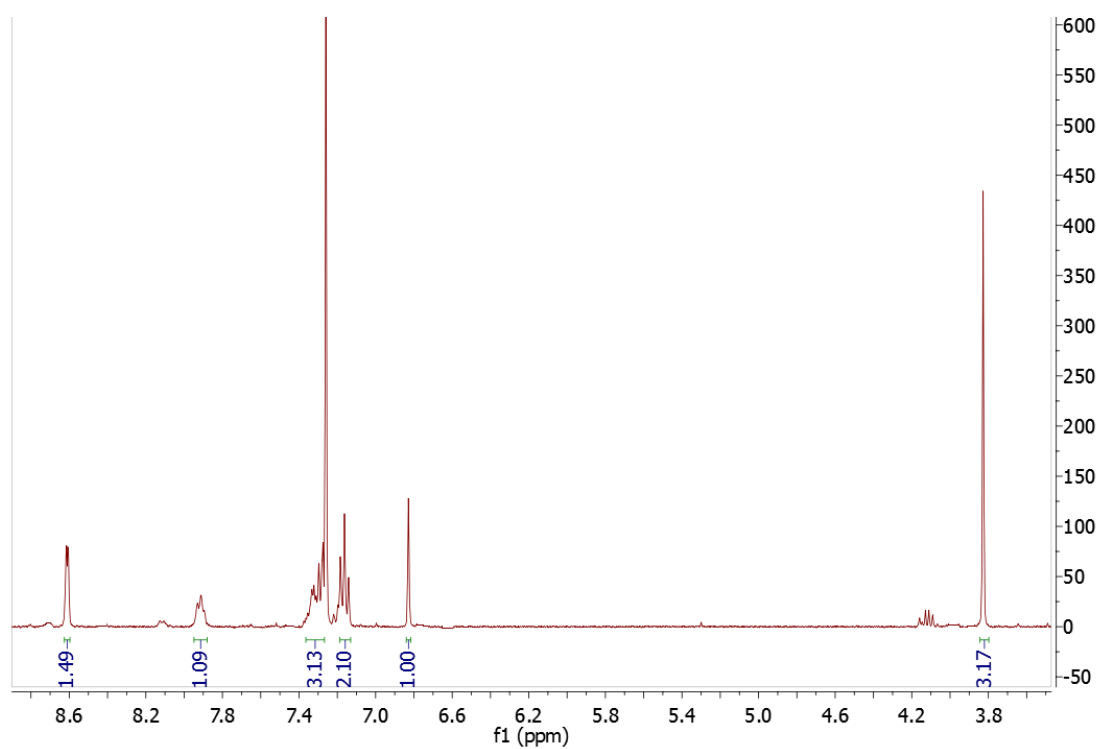
Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto 32c.



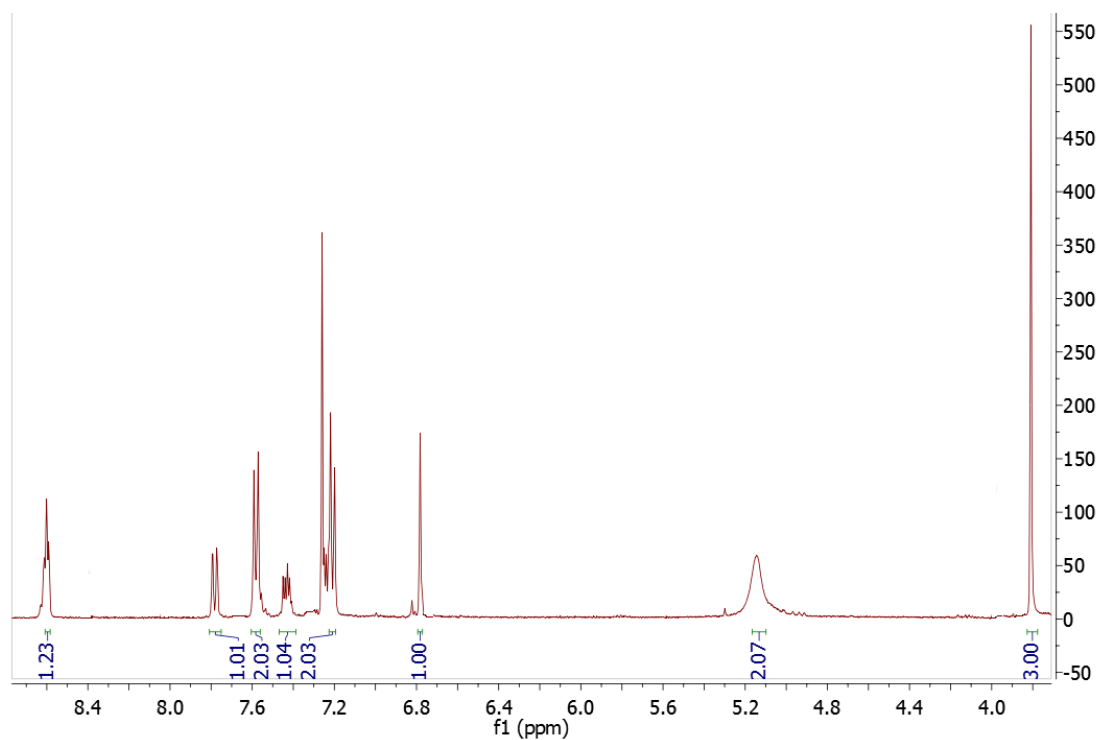
Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto 32d.



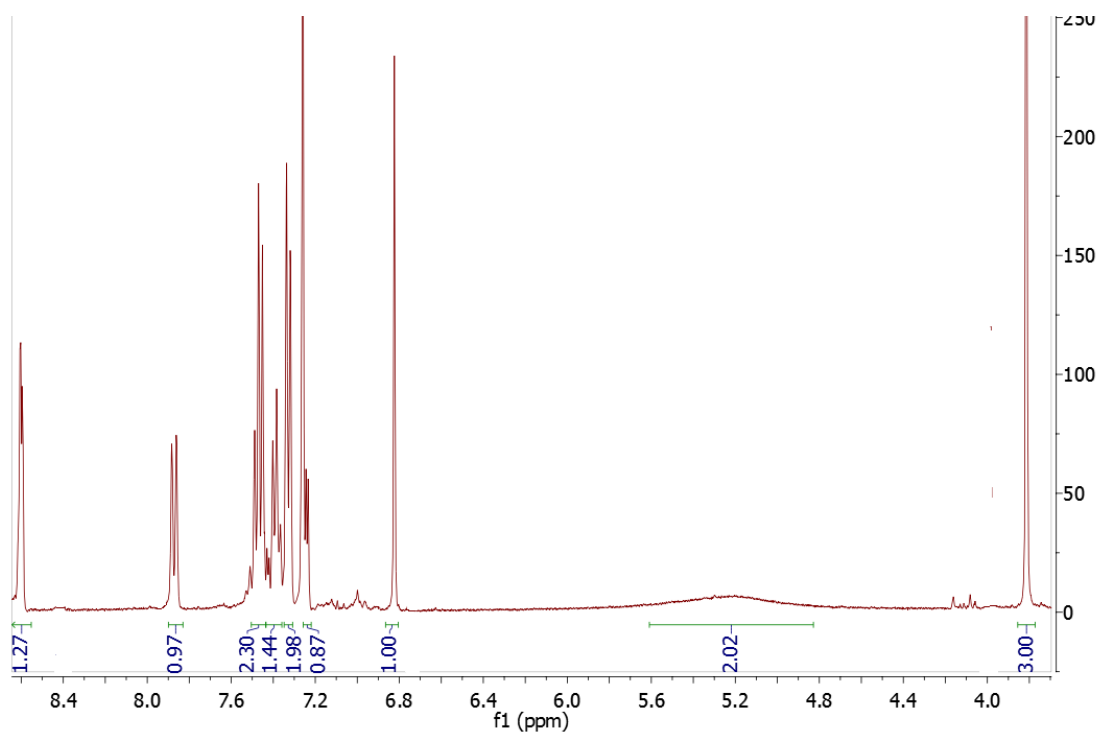
Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto 33a.



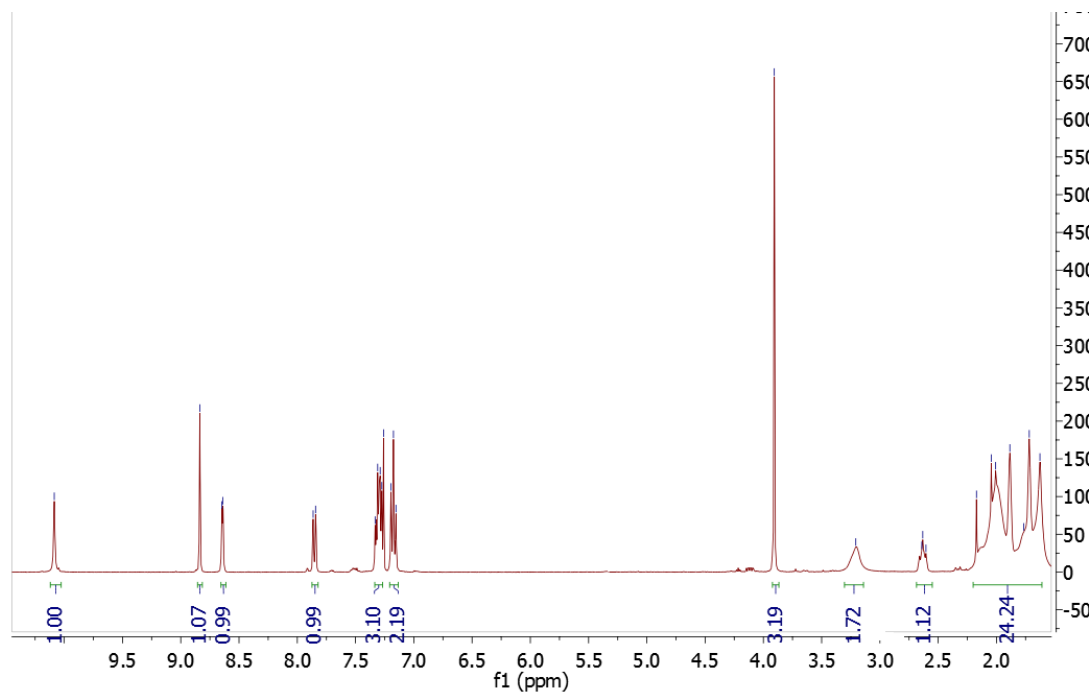
Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto 33 c.



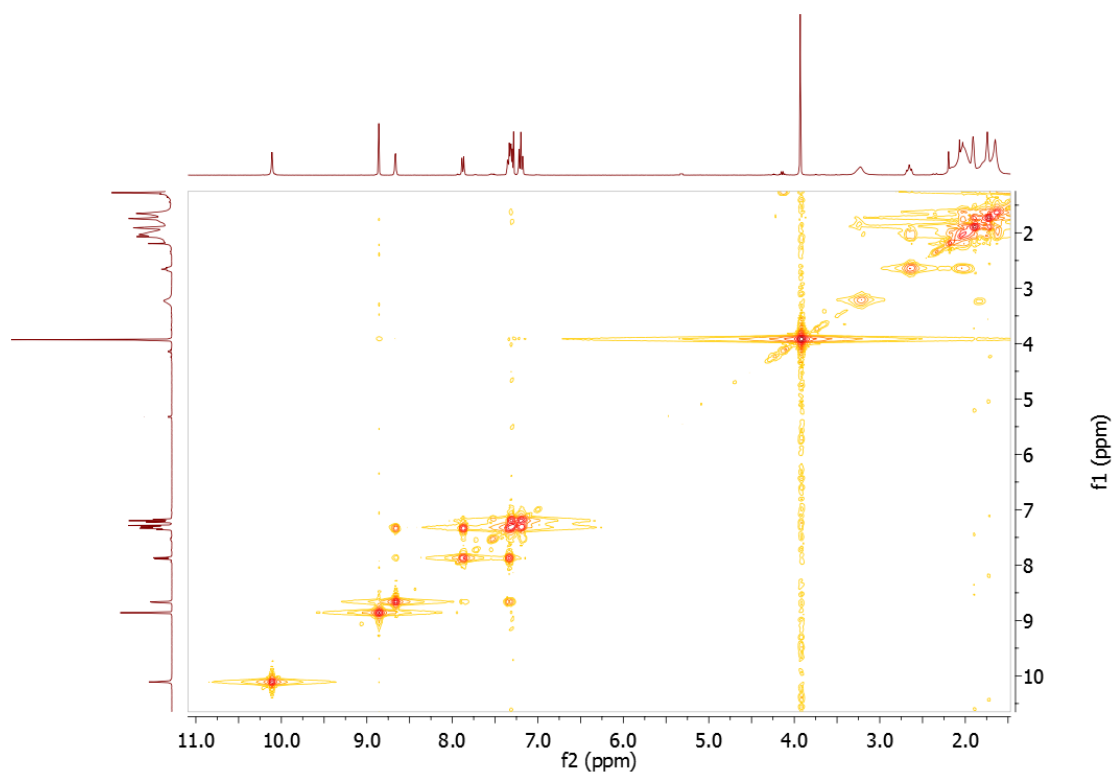
Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto 33 d.



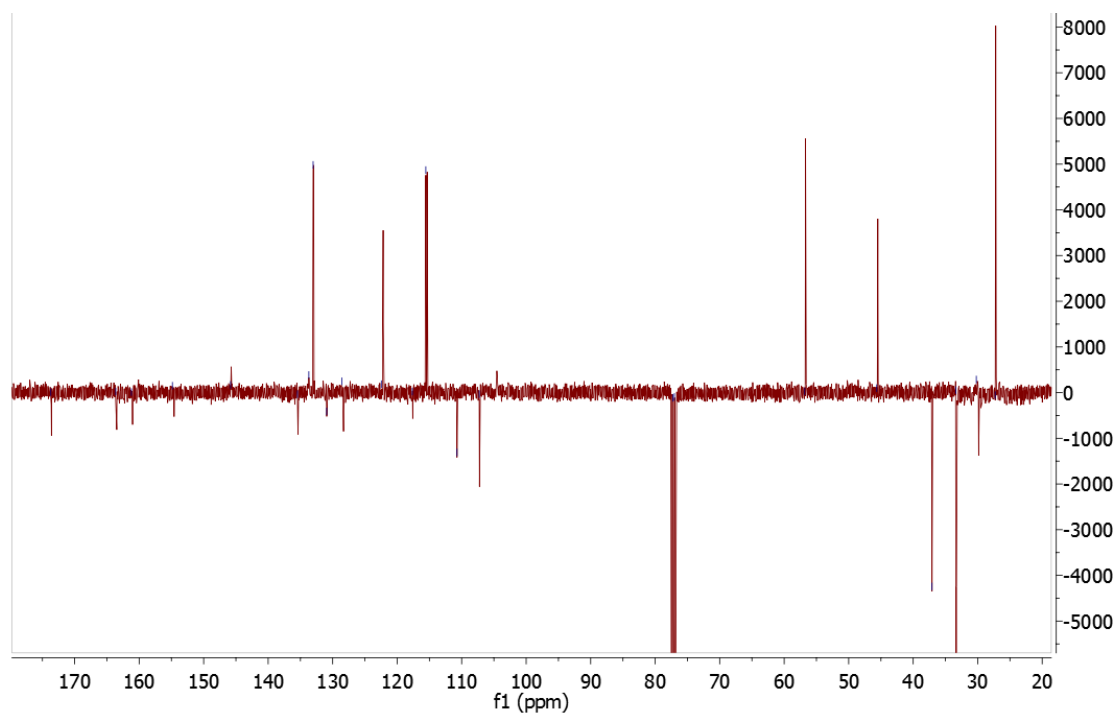
**Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto híbrido 35a.**



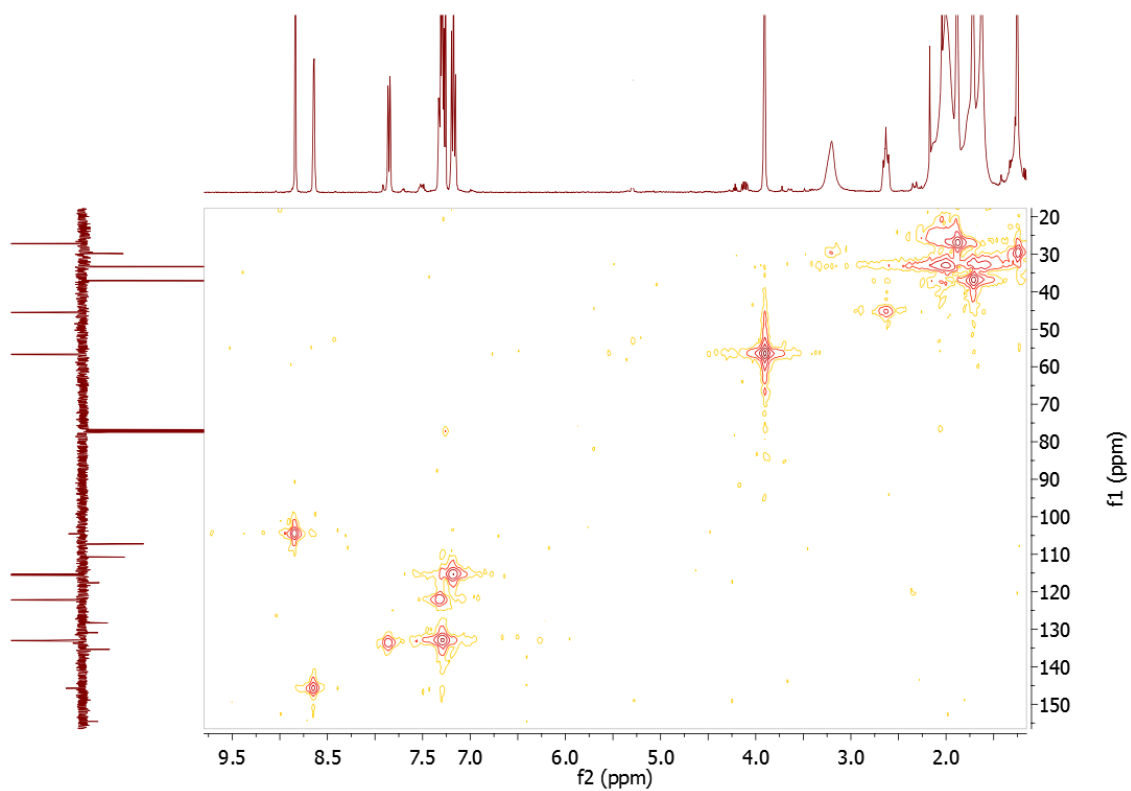
**Espectro COSY do composto híbrido 35a.**



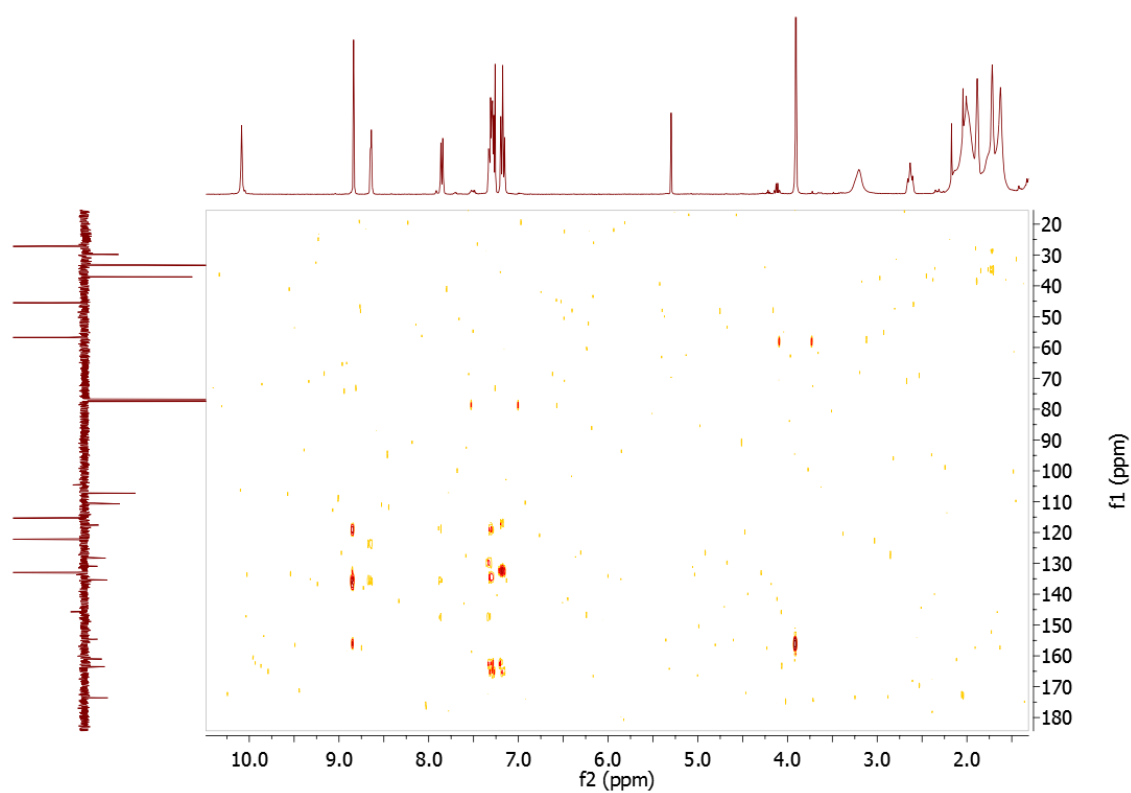
**Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do composto híbrido 35a.**



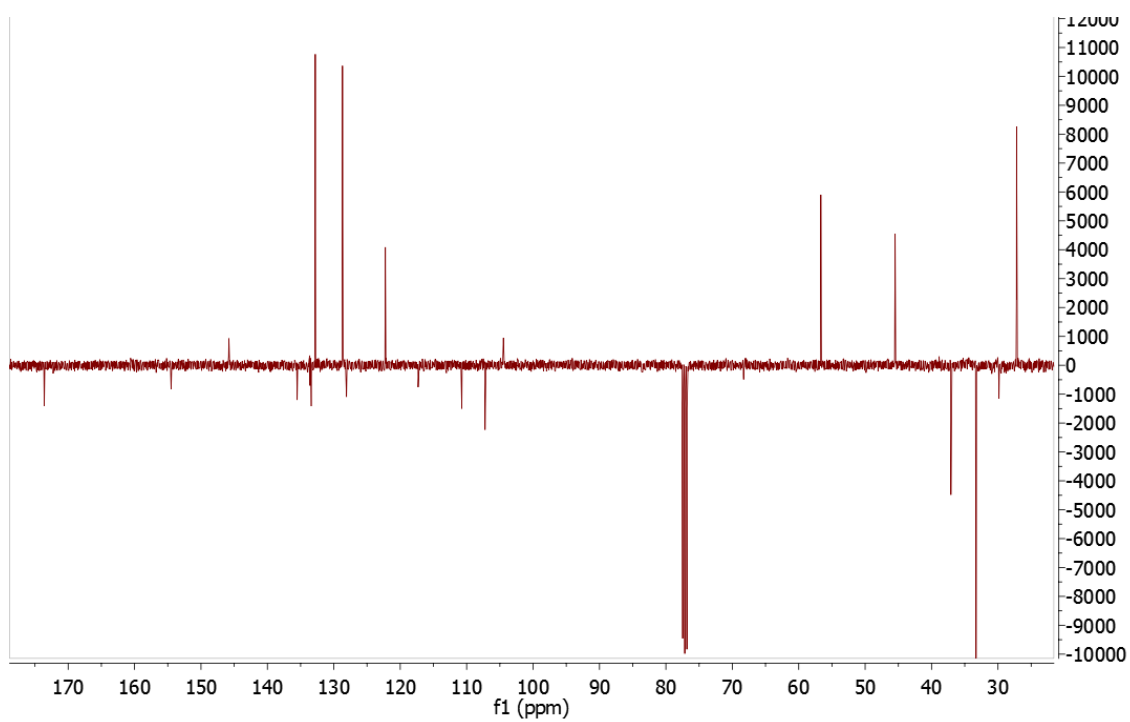
**Espectro HMQC do composto híbrido 35a.**



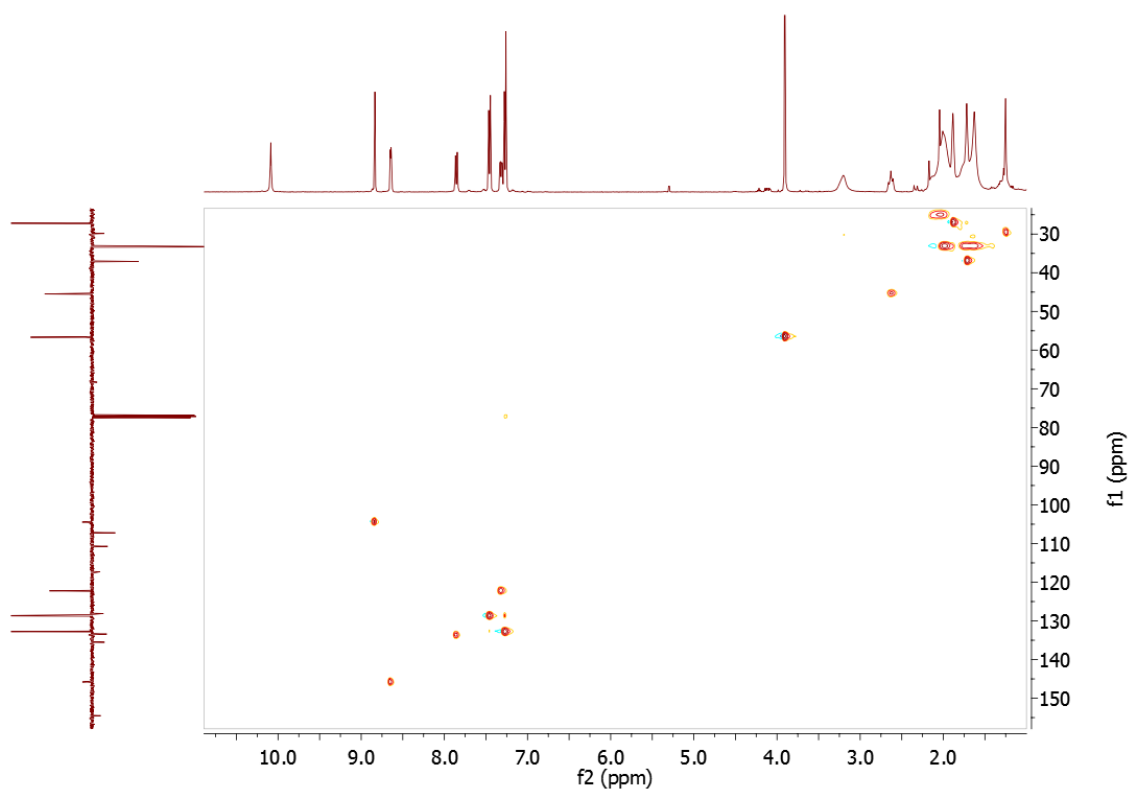
**Espectro HMBC do composto híbrido 35a.**



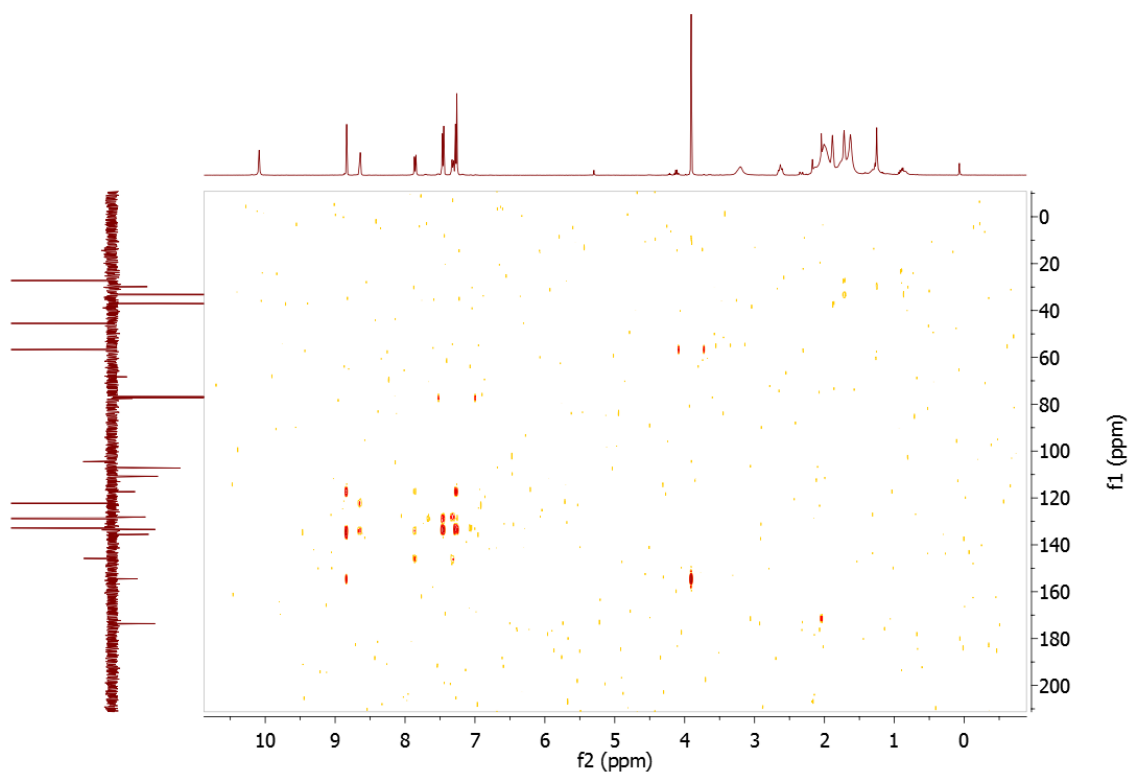
**Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do composto híbrido 35b.**



**Espectro HMQC do composto híbrido 35b.**

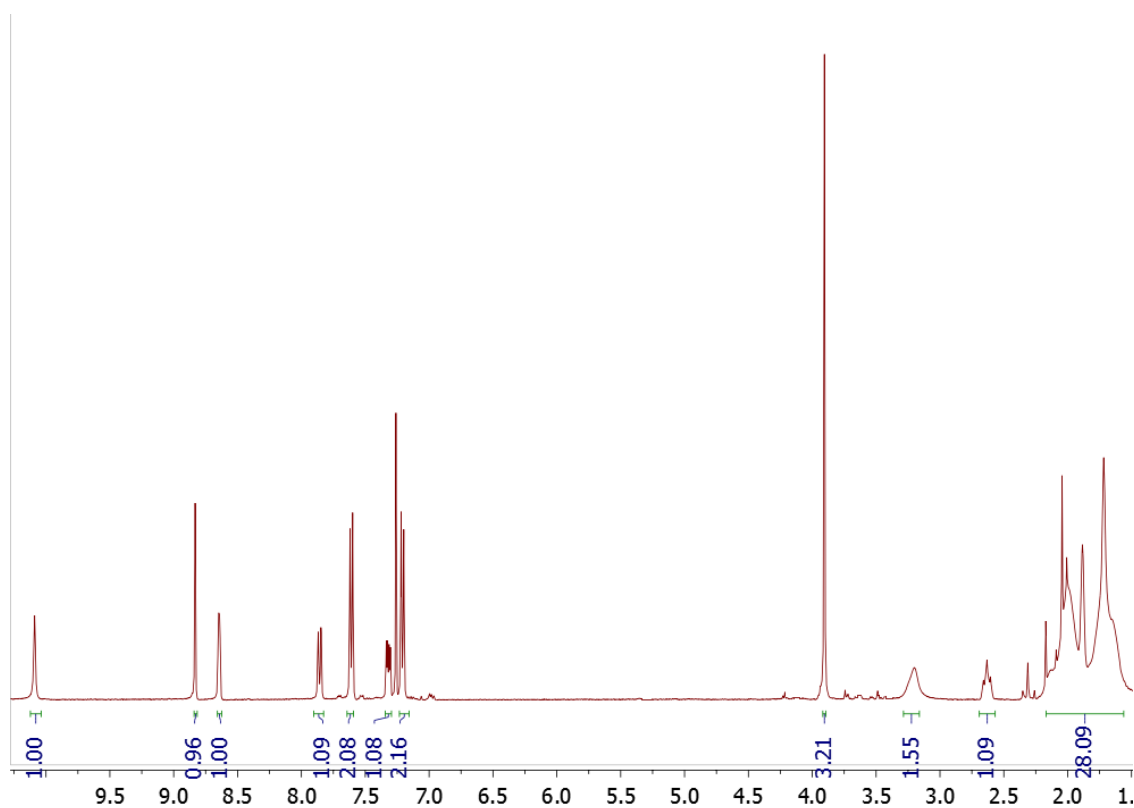


**Espectro HMBC do composto híbrido 35b.**

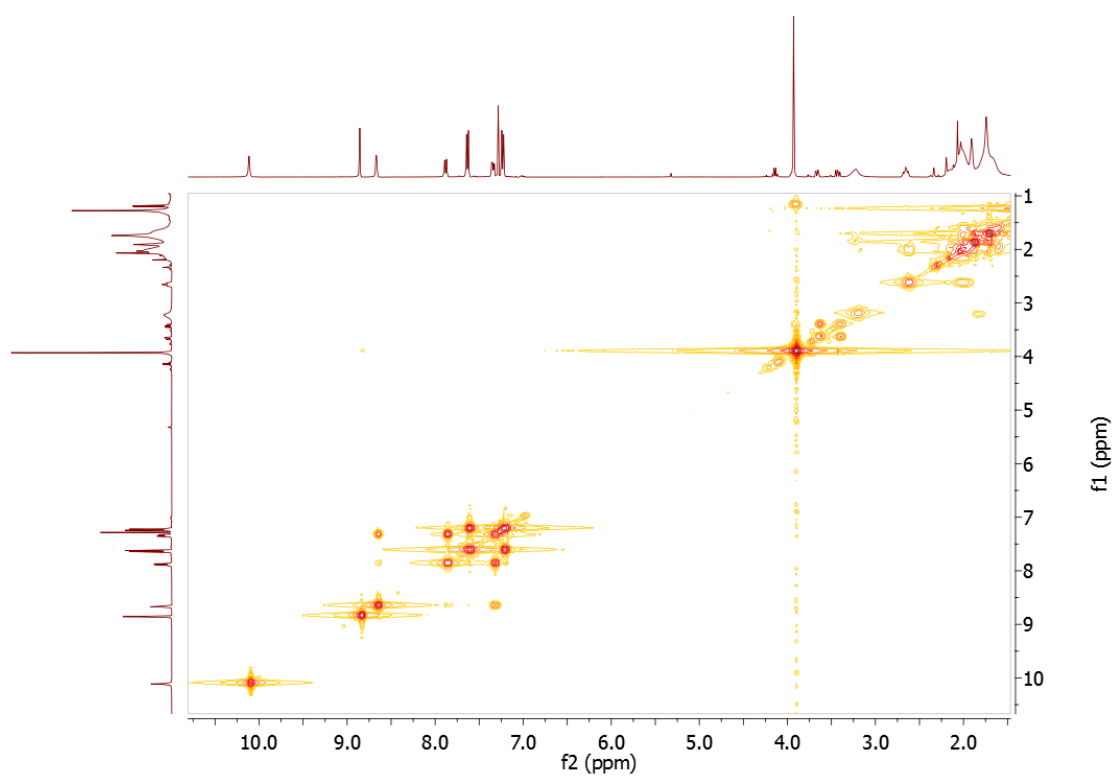




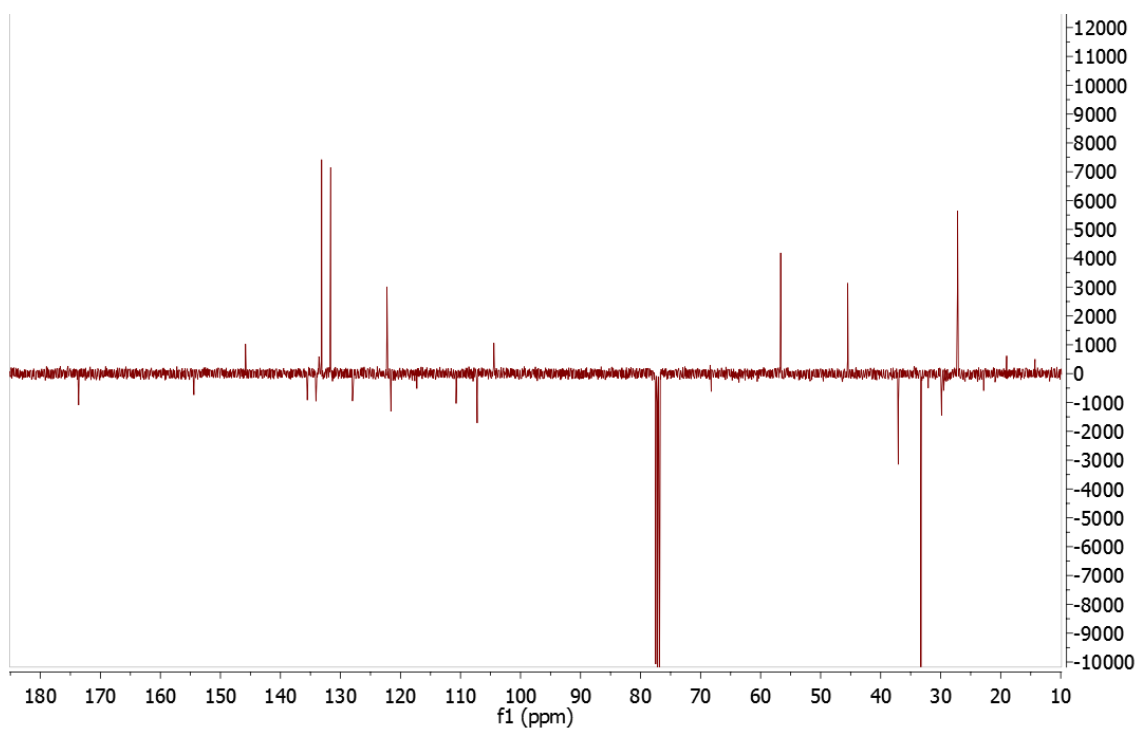
Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto híbrido 35c.



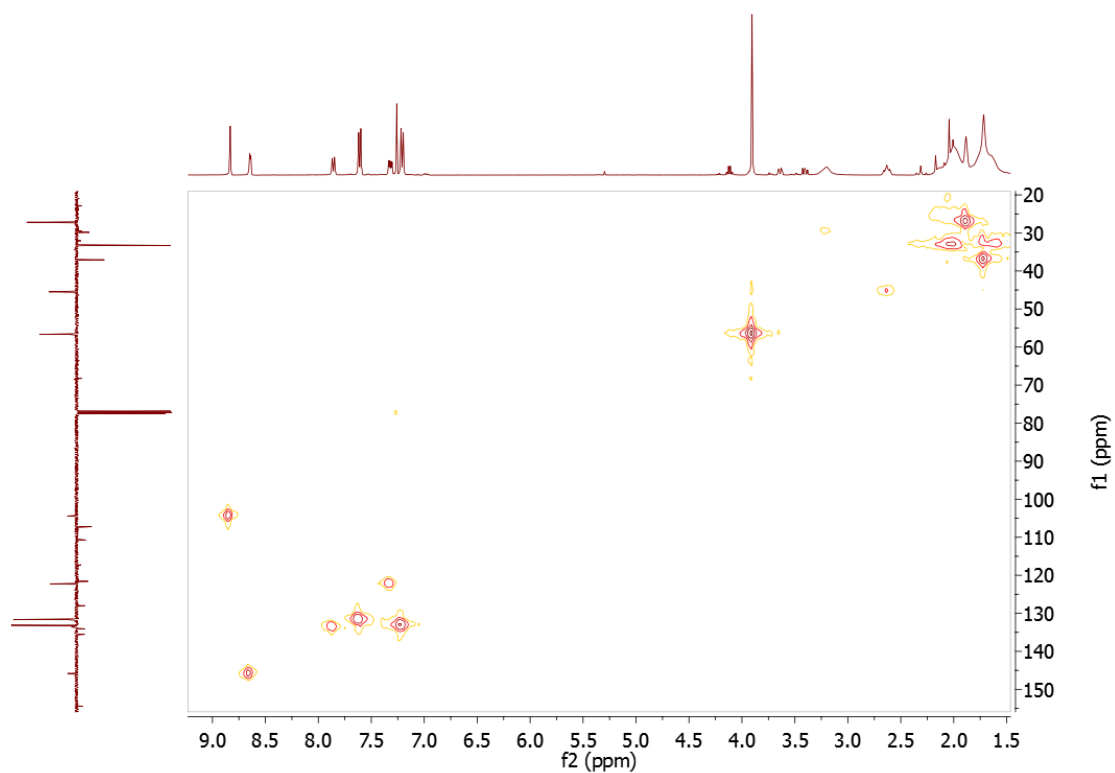
Espectro COSY do composto híbrido 35c.



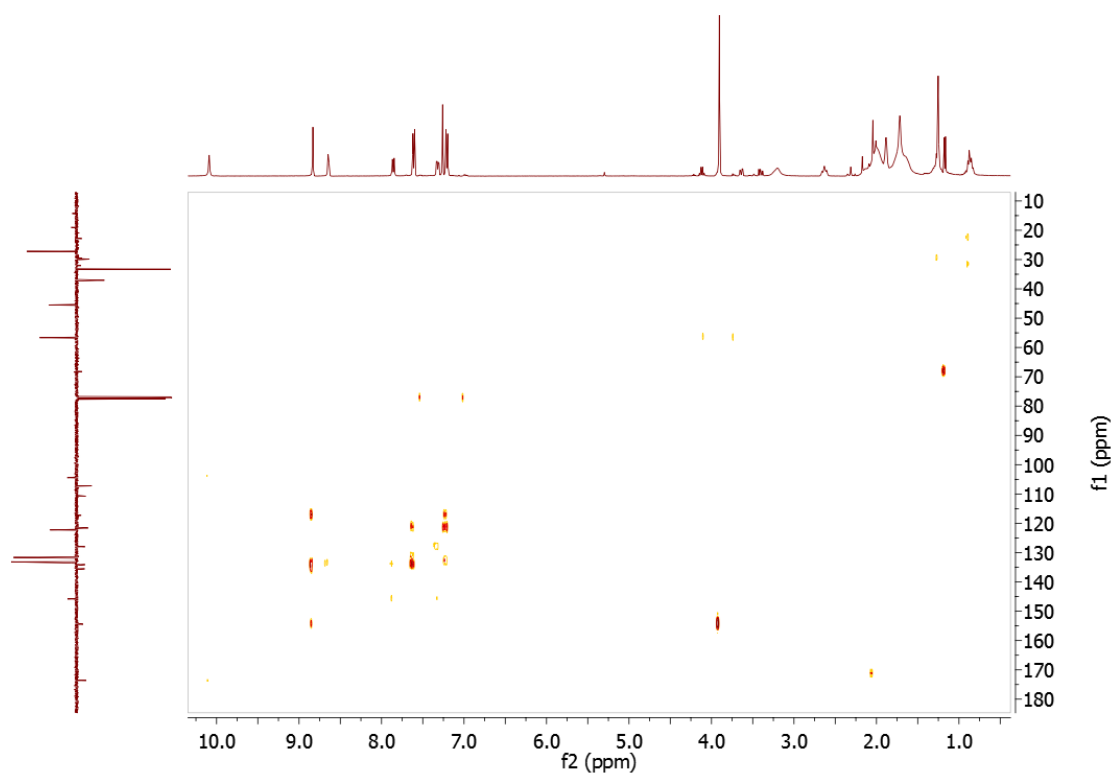
**Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN do composto híbrido 35c.**



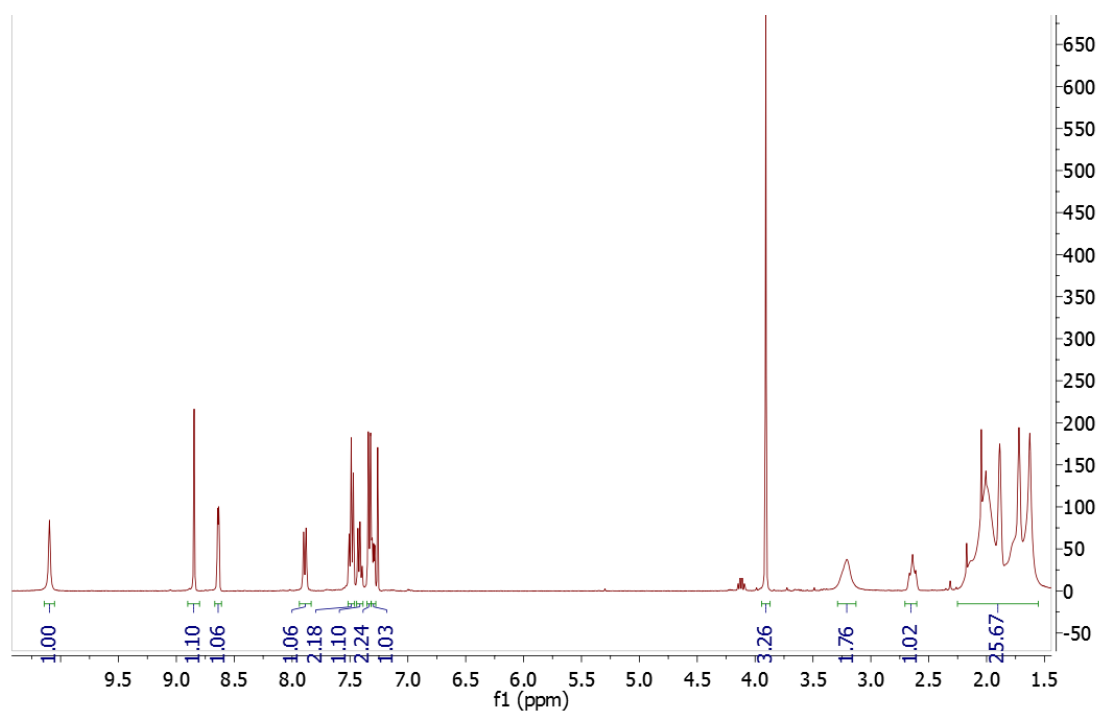
**Espectro HMQC do composto híbrido 35c.**



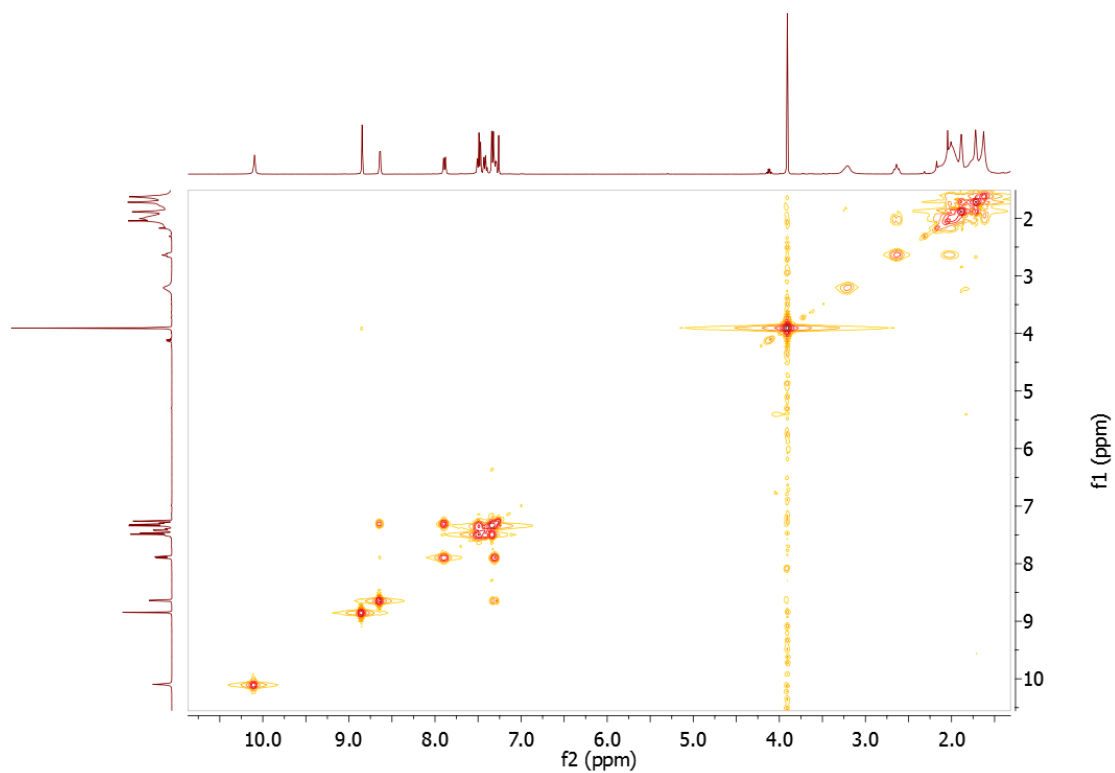
Espectro HMBC do composto híbrido 35c.



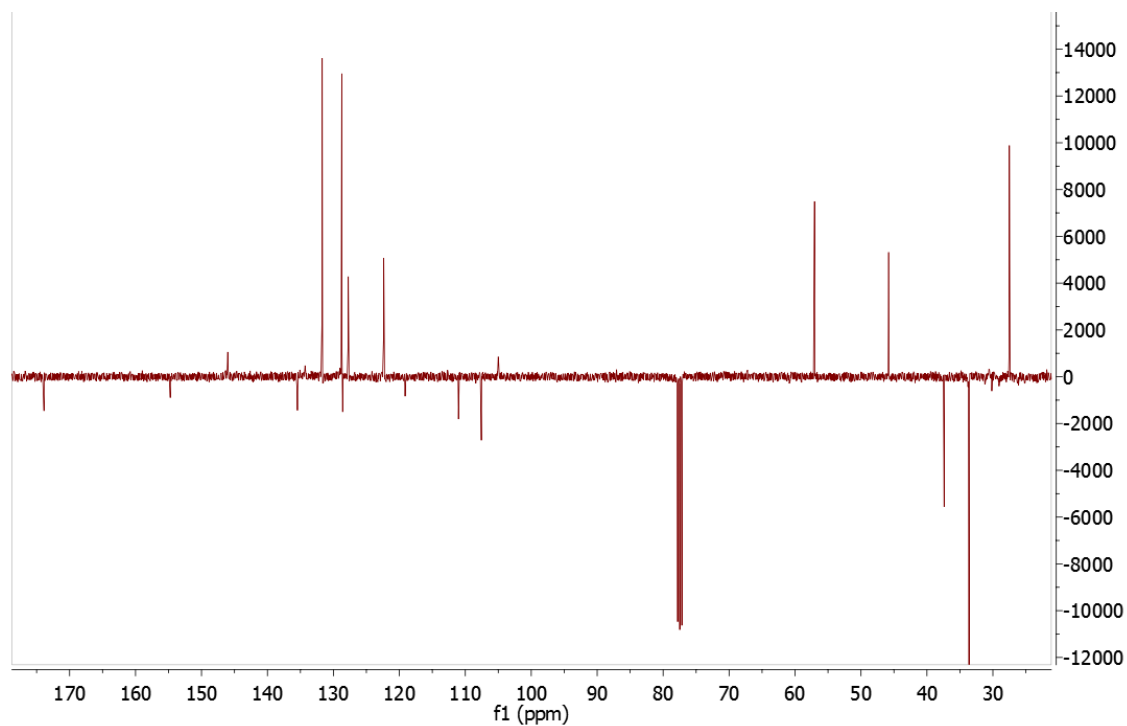
Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto híbrido 35d.



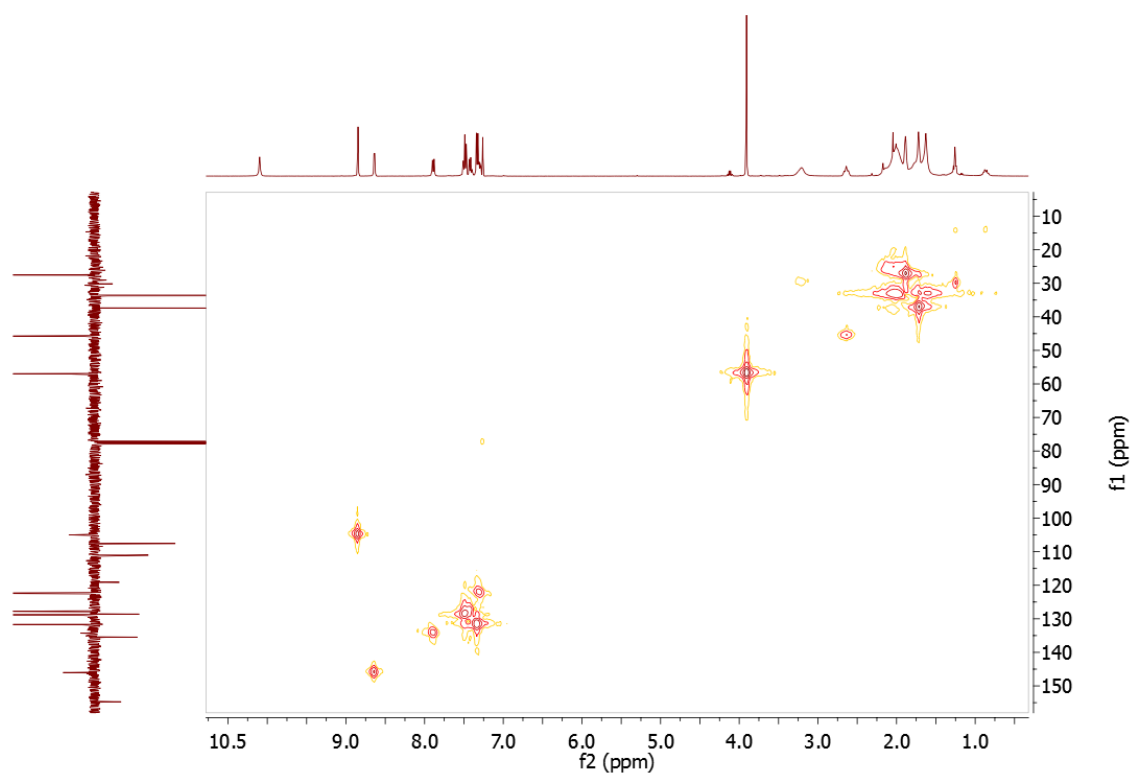
**Espectro COSY do composto híbrido 35d.**



**Espectro <sup>13</sup>C RMN do composto híbrido 35d.**



**Espectro HMQC do composto híbrido 35d.**



**Espectro HMBC do composto híbrido 35d.**

